

Санкт-Петербургский Государственный университет
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Хорошавина Галина Сергеевна

**Тема: «Комплексная характеристика противовирусной активности производных
камфары на модели гриппозной инфекции у животных»**

Выпускная квалифицированная работа магистра

Работа выполнена в лаборатории
безопасности лекарственных средств
в группе по тестированию специфической
активности противовирусных соединений
ФГБУ НИИ Гриппа
Министерства Здравоохранения РФ
Научные руководители:
к.б.н. А.В. Мигунова/к.б.н. В.В. Зарубаев

Санкт-Петербург
2016

Список сокращений:

ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

НА – гемагглютинин (hemagglutinin)

НА – нейраминидаза (neuraminidase)

NP – нуклеопротеин

М – матриксный белок М

MDCK – Madin-Darby canine kidney cells (перевиваемая культура почечного эпителия собаки)

MEM – питательная среда (Minimum Essential Medium)

ЦТД₅₀ – цитотоксическая доза

ЭД₅₀ – эффективная доза

ХТИ – химиотерапевтический индекс

РНК - рибонуклеиновая кислота

PB2 – белок, компонент транскриптазного комплекса

PB1 – белок, коровый компонент транскриптазного комплекса

NS1 - неструктурный белок, локализован в ядре, контролирует сплайсинг и полиаденилирование

NEP - белок ядерного экспорта

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

РКЭ – растущие куриные эмбрионы

ВАЖ - вируссодержащей аллантоисной жидкости

DMEM - среда Игла в модификации Дульбекко

РГА – реакция гемагглютинации

Оглавление

Список сокращений.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
I.1. Вирус гриппа.....	7
I.1.1. Род Influenzavirus A (вирус гриппа типа A).....	7
I.1.2. Род Influenzavirus B (вирус гриппа типа B).....	8
I.1.3. Род Influenzavirus C (вирус гриппа типа C).....	8
I.1.4. Род Influenzavirus D (вирус гриппа типа D).....	9
I.1.5. Строение вириона.....	10
I.1.6. Жизненный цикл вируса гриппа.....	11
I.1.7. Гемагглютинин.....	12
I.2. Препараты применяемые при лечении гриппа. Вирусные мишени для лекарственного вмешательства.....	16
I.2.1. Производные адамантана (амантадин, ремантадин).....	17
I.2.2. Дейтифорин.....	20
I.2.3. Рибавирин.....	21
I.2.4. Ингибиторы нейраминидазы.....	22
I.2.5. Осельтамивир карбоксилат (Тамифлю).....	22
I.2.6. Занамивир (Relenza).....	23
I.2.7. Ингавирин.....	23
I.2.8. Арбидол (Умифеновир).....	24
I.2.9. Интерфероны.....	24
I.2.10. Индукторы интерферонов.....	25
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
II.1. Химические соединения.....	28
II.2. Животные.....	28
II.2.1. Адаптация и отбор животных для исследования.....	28
II.2.2. Содержание животных.....	29
II.2.3. Способ введения препаратов и выбор доз.....	30
II.3. Вирусы и клетки.....	30
II.3.1. Культивирование и хранение вирусных штаммов.....	30
II.3.2. Культивирование вирусов и тестирование препаратов на культуре клеток MDCK.....	31

II.3.3. Реакция гемагглютинации (РГА).....	31
II.3.4. Исследование токсичности препаратов на клеточной культуре MDCK...	32
II.4. Оценка протективной активности производных камфоры на модели летальной гриппозной инфекции.....	32
II.5. Изучение морфогенеза гриппозной инфекции в условиях применения камфецина.....	33
II.6. Получение гистологических срезов и проведение гистологической окраски.....	34
II.7. Электронное микроскопирование.....	34
II.8. Статистический анализ и расчётные формулы.....	35
Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	36
III.1. Изучение вирусингибирующих свойств производных камфоры в культуре клеток.....	36
III.1.2. Сравнительный анализ эффективности исследованных препаратов.....	39
III. 2. Оценка протективной активности производных камфоры на модели летальной гриппозной инфекции.....	44
III. 3. Изучение морфогенеза гриппозной инфекции в условиях применения камфецина.....	44
III. 3. Изучение влияния камфецина на ультраструктурные особенности морфогенеза гриппозной инфекции in vitro.....	51
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
ВЫВОДЫ.....	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	58

ВВЕДЕНИЕ

Грипп — острое инфекционное вирусное заболевание, сопровождающееся поражением верхних дыхательных путей. Среди возникающих осложнений — различные заболевания верхних и нижних отделов дыхательных путей, центральной нервной системы, сердца, почек и других органов. Способность гриппа вызывать ежегодные эпидемии и пандемии в масштабах всего земного шара, позволяет считать его проблемой мирового значения.

Лечение и профилактика гриппа является одной из самых актуальных медицинских и социально-экономических проблем. По данным ВОЗ, ежегодно во время эпидемий гриппа и подобных ему заболеваний в мире болеют до 5 млн, из них до 500 тыс. человек умирают. В России на грипп и ОРВИ ежегодно приходится до 90% от всей регистрируемой инфекционной заболеваемости. Считается, что ежегодно болеют 5-10% взрослых и 20-30% детей. При этом осложнения развиваются у 10-15% заболевших гриппом. Среди госпитализированных больных, чаще в группах риска, этот показатель достигает 30%. Ежегодная смертность вследствие осложнений гриппа составляет 7,5-23 на 100 000 населения, причем большая часть летальных исходов приходится на лиц старше 65 лет. По данным Минздравсоцразвития РФ, в 2004 г. экономические потери от гриппа и ОРВИ составили 86% от всего ущерба, наносимого инфекционными болезнями.

Непрерывная циркуляция вирусов гриппа и появление реассортантных штаммов животного происхождения представляют постоянную опасность. Одновременно с этим в последние годы отмечается распространение устойчивости штаммов вирусов гриппа к применяемым противовирусным препаратам, что делает поиск новых лекарственных препаратов актуальной проблемой современной медицины. Данная работа является продолжением многолетних исследований иминопроизводных камфары в лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ НИИ Гриппа Министерства Здравоохранения РФ.

Цель данного исследования: изучение противовирусной активности производных камфары в отношении вирусов гриппа.

Задачи:

1. Воспроизвести гриппозную инфекцию в культуре клеток MDCK.
2. Оценить цитотоксическую активность производных камфары для клеток MDCK.
3. Изучить уровень репродукции вируса гриппа в присутствии производных камфары в различных концентрациях.

4. Рассчитать 50%-ную цитотоксическую концентрацию и 50%-ную эффективную концентрацию для каждого из исследуемых соединений.
5. Воспроизвести летальную гриппозную инфекцию у животных.
6. Оценить влияние производных камфары на показатели гибели животных и морфологическую структуру тканей легких в ходе гриппозной пневмонии.
7. Изучить закономерности морфогенеза гриппозной инфекции в клетках MDCK при помощи электронной микроскопии.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1. Вирус гриппа

Грипп (фр. *grippe*, от нем. *gripen* — «схватить», «резко сжать») — острое инфекционное заболевание дыхательных путей. Относится к группе острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). Является одним из самых распространенных заболеваний в мире. Ежегодно приводит к возникновению эпидемий, а раз в несколько лет — пандемий. Обладает уникальной способностью к изменчивости, что является причиной широкого распространения инфекции, а так же быстрого приобретения устойчивости к противовирусным препаратам. В настоящее время выявлено более 2000 вариантов вируса гриппа, различающихся между собой антигенным спектром. По оценкам ВОЗ, от всех вариантов вируса во время сезонных эпидемий в мире ежегодно умирают от 250 до 500 тыс. человек (большинство из них старше 65 лет), в некоторые годы число смертей может достигать миллиона. В России ежегодно регистрируют от 27,3 до 41,2 млн. заболевших гриппом и другими ОРВИ.

Возбудителями гриппа являются представители сем. *Orthomyxoviridae*. Это семейство включает три рода: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* (Таблица 1) и недавно открытый *Influenzavirus D*.

I.1.1. Род *Influenzavirus A* (вирус гриппа типа A)

Вирион содержит 8 сегментов генома, входящих в состав нуклеопротеиновых комплексов. Нуклеопротеиновый комплекс содержит РНК связанную с белком — нуклеопротеином, а также с РНК-зависимой-РНК-полимеразой. Полимераза вируса гриппа включает в себя три субъединицы: кислый белок полимеразного комплекса и два основных белка полимеразы. В процессе упаковки РНК в нуклеопротеин происходит образование так называемого кора, вокруг которого формируется спиральная структура РНК (Hutchinson et al., 2010). Геном, упакованный в нуклеопротеиновый комплекс, окружен матричным белком М1 и окружен липидной оболочкой, которая представляет собой фрагмент билипидного слоя мембраны хозяйской клетки, содержащий вирусные белки: гемагглютинин, нейраминидазу и белок М2 (Lamb, Zebedee, Richardson, 1985). Вирус инфицирует птиц, лошадей, собак, свиней и человека. Вирусы данного типа подразделяются на подтипы, в соответствии с различными видами и сочетаниями двух поверхностных антигенов вируса, белков гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА).

Существует шестнадцать подтипов гемагглютинина (Н1-Н16) и девять нейраминидазы (N1-N9) (Beard, 1998; <http://www.cdc.gov/flu/avian/index.htm>; <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf>; Olsen, 2002). Эти белки участвуют в прикреплении вируса к клетке-мишени и выходе вирусного потомства из клетки-хозяина, также они являются главной мишенью иммунного ответа (Heinen, 2004; Reid, Taubenberger, 2003; Couch, 1996). Для каждого вида млекопитающих характерны определенные типы поверхностных антигенов (Fenner et al., 1987). Вирусы гриппа А также подразделяются на штаммы. Наименование штамма вируса гриппа включает название их типа, хозяина, место первого выделения, номер штамма (если таковые имеются), год выделения и подтипы поверхностных антигенов (Acha, Szyfres, 2003; Fenner et al., 1987), например, штамм H7N7 подтипа вируса гриппа лошадей, впервые выделенный в Чехословакии в 1956 году - A/eq/Prague/56(H7N7). Для штаммов вирусов, поражающих человека, название хозяина опускается. Из многих подтипов вирусов гриппа А в настоящее время среди людей циркулируют подтипы гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2). Все пандемии гриппа были вызваны именно вирусами типа А.

I.1.2. Род *Influenzavirus В* (вирус гриппа типа В)

Его геном также состоит из 8 сегментов. Вирусы гриппа В обнаруживаются преимущественно у человека, и способны вызывать эпидемии, в среднем, раз в 3-4 года, хотя и не становились до сих пор причиной пандемий (Acha, Szyfres, 2003). Также этот вирус был выделен от тюленей, свиней и хорьков (Acha, Szyfres, 2003; Heinen, 2003; Komadina et al., 2007; Brown, Harris, Alexander, 1991; Jakeman, 1994). Антигенный дрейф у вируса типа В происходит значительно медленнее, чем у вирусов типа А (Acha, Szyfres, 2003; Smith, 2006), возможно, это связано с ограниченным кругом хозяев.

I.1.3. Род *Influenzavirus С* (вирус гриппа типа С)

Геном этого вируса состоит из 7 сегментов. Вирусы гриппа С, в основном, связаны с заболеваниями людей (Acha, Szyfres, 2003; Couch, 1996; <http://www.phacaspc.gc.ca/msds-ftss/index.html>; Greenbaum, Morag, Zakay-Rones, 1998), также были обнаружены среди свиней (Acha, Szyfres, 2003; Heinen, 2003; Fenner et al., 1987; Komadina et al., 2007; Brown, Harris, Alexander, 1995; Kimura et al., 1997; Manuguerra et al., 1993; Yamaoka et al., 1991) В отличие от двух предыдущих типов не имеет нейраминидазы. До недавнего времени считалось, что вирусы данного типа не способны вызывать масштабные эпидемии.

Однако крупная эпидемия гриппа С была зарегистрирована в Японии в период с января по июль 2004 года (Matsuzaki et al., 2007). Вирусы типа С не классифицируются на подтипы, но подразделяются на штаммы (<http://www.cdc.gov/flu/avian/index.html>). Каждый штамм является антигенно стабильным и накапливает небольшие изменения с течением времени. Последние данные свидетельствуют о том, что рекомбинация происходит чаще всего между различными штаммами вирусов гриппа С (Matsuzaki et al., 2003; Matsuzaki et al., 2002).

Сравнительная характеристика вирусов А, В и С

Таблица 1.

Признак	А	В	С
Первое выделение вируса от человека	1933 г.	1940 г.	1947 г.
Серотип нуклеопротеина	А	В	С
Субтипы (по гемагглютину и нейраминидазе)	Да	Нет	Нет
Резервуар среди животных	Да	Нет	Нет
Способность вызывать:			
• пандемии*	+++	–	–
• эпидемии*	+++	++	–
• локальные вспышки*	+	++	+
Поражаемые возрастные группы	Все	Все	Дети, редко взрослые
Тяжесть заболевания	+++	++	+
Количество РНК-сегментов	8	8	7
Поверхностные антигены:			
• гемагглютинин	Да	Да	Да
• нейраминидаза	Да	Да	Нет**
Изменчивость поверхностных антигенов:			
• интенсивность	+++	+	+/-
• шифт	Да	Нет	Нет
• дрейф	+++	+	+/-
Чувствительность к ремантадину/амантатану	Да	Нет	?

Примечание.

* — Под вспышкой следует понимать групповую заболеваемость в ограниченном организованном коллективе (детское учреждение, учебное заведение, воинская часть, предприятие и т.п.). Под эпидемией — превышение ожидаемого неэпидемического уровня острых респираторных инфекций в городе и одной стране. Пандемия — ряд последовательных эпидемий одной этиологии в нескольких странах, расположенных в разных частях света.

** — У гриппозного вируса типа С нейраминидазу заменяет ацетилэстераза, отрезающая ацетильные группы гликопротеинов.

(по: Маянский, 2009)

I.1.4. Род *Influenzavirus D* (вирус гриппа типа D)

Филогенетический анализ показывает, что этот тип вируса гораздо ближе к вирусу типа С, чем к А и В. Тем не менее, расстояние между новым вирусом (D) и вирусом типа С пропорционально разнице между типами А и В для большинства геномных сегментов (Hause et al., 2013). Вирус был выделен у свиней в США, а так же у крупного рогатого скота во Франции и Китае (Ducatez, Pelletier, Meyer, 2015; Jiang et al., 2014). Так же обнаружено, что к вирусу восприимчивы овцы, козы, люди, хорьки и морские свинки (Hause et al., 2013; Hause et al., 2014). Геном состоит из 7 сегментов, кодирующих 9

белков, включая гемагглютинин, полимеразы PB2, PB1, и P3, нуклеопротеин, белки матрикса (M1 и M2), и неструктурные белки (NS1 и NEP) (Hause et al., 2013).

I.1.5. Строение вириона

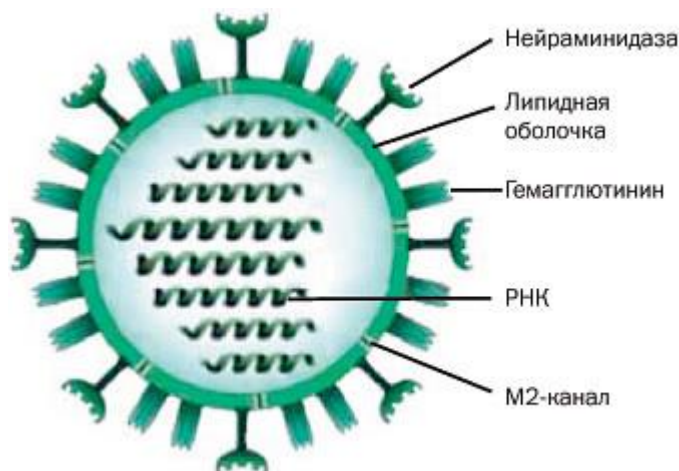


Рисунок 1. Строение вируса гриппа (по: <http://allwantsimg.com/virus-grippa>)

Вирусы гриппа – оболочечные вирусы с сегментированным геномом, представленным одноцепочечной антисмысловой РНК (рис. 1). Геном вирусов гриппа состоит из 8 сегментов, в составе вириона связанных в нуклеопротеиновые комплексы. Нуклеопротеиновый комплекс включает в себя РНК связанную с белком – нуклеопротеином и с РНК-зависимой-РНК-полимеразой. Полимераза вируса гриппа состоит из трех субъединиц: двух основных белков полимеразы и кислого белка полимеразного комплекса. В процессе упаковки РНК в нуклеопротеин образуется так называемый кор - сердцевину вокруг которой РНК формирует спиральную структуру (Hutchinson et al., 2010) Геном, упакованный в нуклеопротеиновый комплекс, располагается в матриксе, образованном матриксным белком М1 и окружен липидной оболочкой, представляющей собой фрагмент билипидного слоя мембраны клетки хозяина, содержащий вирусные белки: гемагглютинин, нейраминидазу и белок М2 (Lamb, Zebedee, Richardson, 1985). Гемагглютинин и нейраминидаза являются основными антигенными детерминантами вируса, и вариации в их структуре приводят к появлению новых эпидемических и пандемических штаммов вируса гриппа. В настоящее время насчитывается 18 серотипов гемагглютинина и 11 – нейраминидазы (Wu et al., 2014). В вирионе также присутствует белок ядерного экспорта (NEP ранее обозначавшийся как NS2), в комплексе с белком М1 (Yasuda et al., 1993).

I.1.6. Жизненный цикл вируса гриппа

Сигналом для входа вириона гриппа в клетку является взаимодействие гемагглютинаина с рецептором клеточной поверхности, содержащим сиаловую кислоту (Skehel, Wiley, 2000). После связывания с рецептором происходит слияние оболочки вируса и мембраны клетки-хозяина, после чего вирус попадает внутрь клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза в клатрин-окаймленной везикуле. Закисление среды внутри эндосомы до значений pH 5,0-6,0 приводит к структурным изменениям в молекуле гемагглютинаина, приводящим к слиянию оболочки вируса с мембраной эндосомы, в результате чего вирион попадает в цитоплазму (Helenius, 1992). Для обеспечения слияния молекула гемагглютинаина HA0 подвергается расщеплению на субъединицы HA1 и HA2, что приводит к освобождению пептида слияния, расположенного на N-конце субъединицы HA2. Белок M2, минорный компонент оболочки вируса гриппа, являющийся протонной помпой, пропускающей ионы H⁺ внутрь оболочки вируса до слияния мембран, обеспечивает диссоциацию M1-капсида от рибонуклеопротеинового комплекса (Whittaker, Bui, Helenius, 1996), что обеспечивает эффективный транспорт генетического материала вируса в цитоплазму зараженной клетки. Далее РНК вируса транспортируется в ядро клетки за счет взаимодействия белка NP вируса с компонентами клеточного цитоскелета (O'Neill et al, 1995). В ядре клетки генетический материал вируса транскрибируется вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой с получением мРНК, на основе которых производится синтез вирусных белков (Hay et al, 1977). В процессе репликации вируса с генетических сегментов, состоящих из антисмысловой РНК вирусной полимеразой, считываются смысловые копии, которые служат матрицей для синтеза антисмысловых генетических сегментов, предназначенных для упаковки в новые вирионы, что также осуществляется РНК-зависимой РНК-полимеразой вируса (Zhang, Pekosz, Lamb, 2000).

Сборка вирионов начинается в ядре клетки с присоединения NP к сегментам РНК и формирования рибонуклеопротеиновых комплексов. Отдельные белки NP формируют комплексы, вокруг которых происходит упаковка РНК-сегмента. Концевые участки РНК содержат сигналы упаковки, обеспечивающие упаковку сегментов в вирион. Каким образом детерминируется состав сегментов в вирионе при упаковке, до сих пор неизвестно точно, но предполагается, что процесс детерминируется РНК-РНК взаимодействиями между сегментами, поскольку зрелые вирионы вируса гриппа редко содержат неправильный или избыточный набор генетических сегментов (Hutchinson et al., 2010).

Для окончательной сборки вириона упакованный в рибонуклеопротеиновый комплекс генетический материал покидает ядро клетки, в данном процессе задействованы белки NEP и M1. Далее нуклеокапсид, в комплексе с белком NEP, перемещается к области raft-микродоменов мембраны и там выходит из клетки, в процессе выхода приобретая оболочку, в которой содержатся белки гемагглютинин, нейраминидаза и M2 (Nayak, Hui, Barman, 2004). Основную роль в процессе отпочковывания от мембраны играет белок M1, который взаимодействует с мембраной клетки N-концевым доменом (Zhang, Pekosz, Lamb, 2000). Для окончательного освобождения вириона необходима работа нейраминидазы: она предотвращает агрегацию вирионов непосредственно после выхода и не позволяет им связываться с сиало-содержащими рецепторами клеточной поверхности (Liu et al, 1995).

I.1.7. Гемагглютинин

Гемагглютинин вируса гриппа является интегральным белком липидной оболочки вируса. Он отвечает за специфическое распознавание рецепторов, прикрепление вириона к поверхности клетки хозяина и плавление мембраны эндосомы, обеспечивающее выход вирусной частицы в цитоплазму клетки (Skehel, Wiley, 2000).

Гемагглютинин – гомотример (рис. 2), трансмембранный гликопротеин I типа, цилиндрической формы, размером примерно 135 Å в высоту и 35–70 Å в радиусе. Каждый мономер состоит из глобулярной головки и ножки, в негликозилированной форме молекулярная масса мономера около 60 кДа. Глобулярный домен полностью принадлежит субъединице HA1, ножка состоит из частей, принадлежащих как субъединице HA1, так и субъединице HA2 (Sriwilaijaroen, Suzuki, 2012).

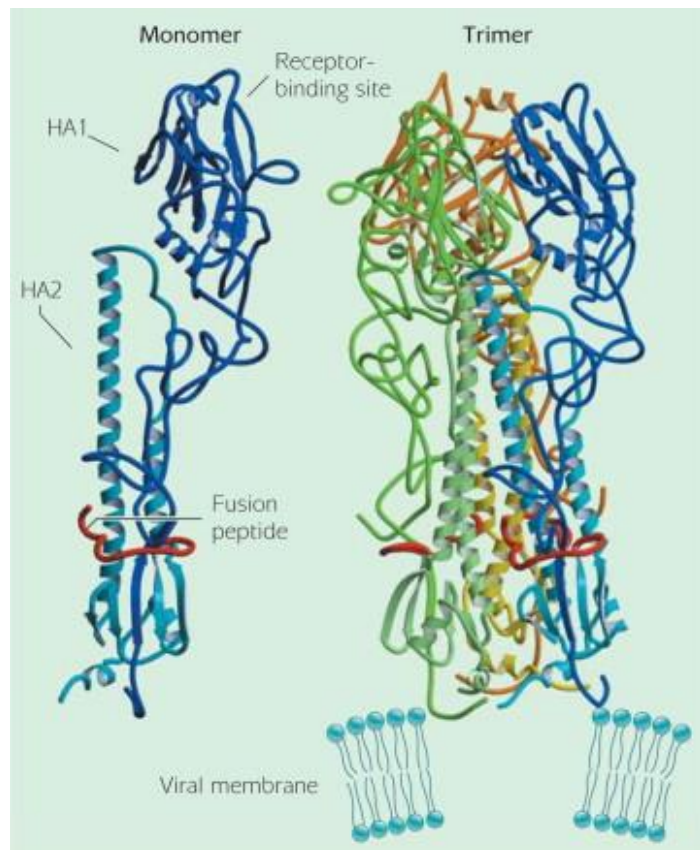


Рисунок 2. Строение гемагглютинаина вируса (по: Isin, Doruker, Bahar, 2002).

До расщепления на цепи HA1 и HA2 каждый мономер представляет собой единую цепь HA0. В процессе синтеза HA0 котрансляционно транспортируется в эндоплазматический ретикулум, затем через систему цистерн комплекса Гольджи транспортируется на плазматическую мембрану. HA0 расщепляется на субъединицы HA1 (327 аминокислот) и HA2 (222 аминокислоты), соединенные дисульфидными мостиками. Свободные концы в сайте расщепления (С-конец HA1 и N-конец HA2) отстоят друг от друга на расстояние 20 Å. В молекуле HA0 в сайте расщепления большая часть вирусов гриппа содержит остаток аргинина, у высокопатогенных штаммов птичьего гриппа в данном участке располагается ряд остатков положительно заряженных аминокислот (Stieneke-Grober et al, 1992).

Каждый мономер заякорен в мембране спирально уложенным трансмембранным пептидом длиной 27-28 аминокислот, расположенным в области С-конца каждой из цепей HA2, последние 10 аминокислот формируют короткий участок, расположенный в цитозоле (Wiley, Skehel, 1987). Глобулярные участки гемагглютинаина сформированы аминокислотными остатками HA1 116 –261, уложенными в «jelly-roll»-мотив из 8 антипараллельных слоев (рис.3).

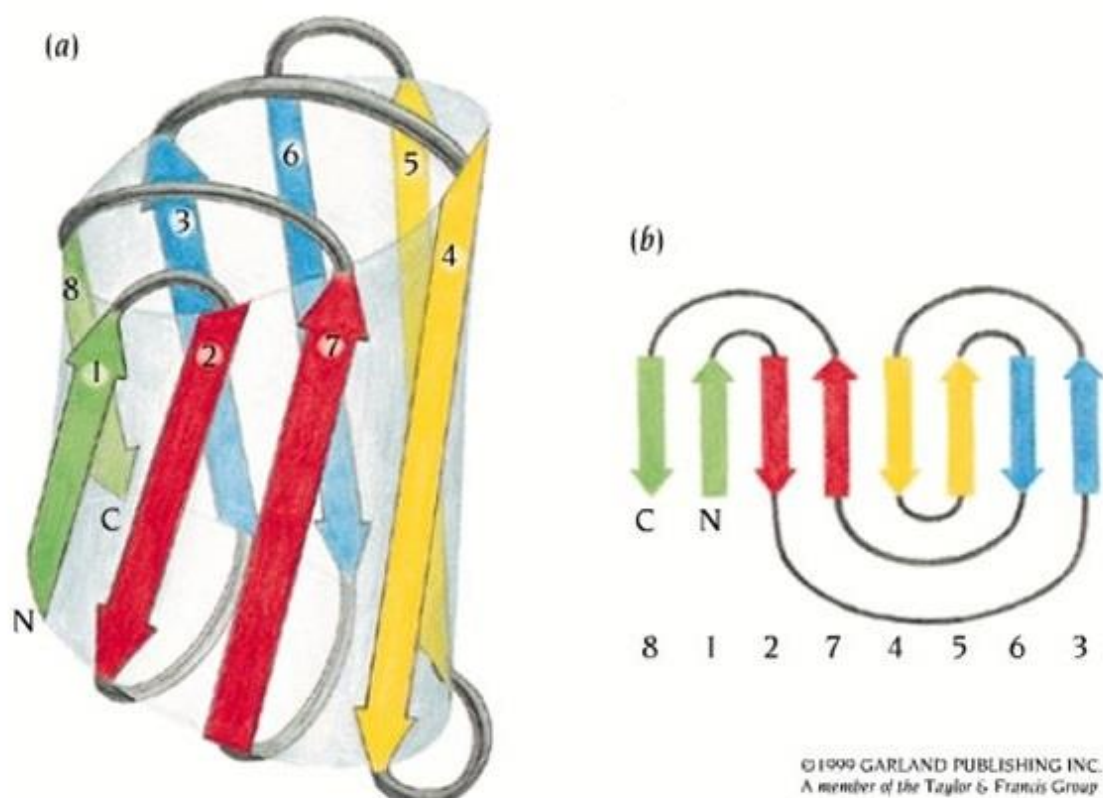


Рисунок 3. «Jelly-roll»-мотив (по: Isin, Doruker, Bahar, 2002).

Дистальные концы глобулярных участков содержат высококонсервативные рецептор-связывающие карманы, вокруг которых располагаются высоковариабельные антигенные сайты (Isin, Doruker, Bahar, 2002; Weis et al, 1988). Оставшиеся части HA1 входят в структуру ножки в основном в составе β -слоев. HA2, которая формирует основную часть ножки, уложена преимущественно в спиральную структуру длиной 80 Å. Первые 20 аминокислот субъединицы HA2 представляют собой гидрофобный пептид слияния, необходимый для выхода вируса из эндосомы (Isin, Doruker, Bahar, 2002). Строение пептида слияния является важной детерминантой патогенности вируса гриппа, и мутации в данной области влияют на активность гемагглютинина и, соответственно, эффективность запуска инфекционного цикла вируса (Wilson, Skehel, Wiley, 1981). Пептид слияния богат глицином, что обеспечивает достаточную гибкость в данном участке. При нейтральном pH N-концы пептидов слияния расположены в пространстве между субъединицами тримера в трансмембранном участке. При снижении pH участок претерпевает конформационные изменения, необходимые для установления контакта между гидрофобными областями мембраны эндосомы и молекулы гемагглютинина (Isin, Doruker, Bahar, 2002). N-связанные олигосахариды, оказывающие значительное влияние на функции гемагглютинина, обнаружены в глобулярном домене и в ножке тримера. В

глобулярной части расположение сайтов гликозилирования варьируемо, в ножке, как в субъединице HA1, так и в субъединице HA2 – более консервативно (Schulze, 1997; Wang et al, 2009).

При проникновении вируса в клетку хозяина ее мембрана дестабилизируется с помощью специфических белков слияния. Известно 4 класса таких белков. Белки класса I представляют собой богатые α -спиралями префузионные тримеры формирующие биспиральные структуры, вставляющие гидрофобные фузионные пептиды или петли (FPs or FLs) в мембрану, превращаясь в постфузионные тримеры. Фузогенные белки класса II это богатые β -листами префузионные гомо- или гетеродимеры, которые вставляют в мембрану FLs превращаясь в постфузионные тримеры. Класс III включает белки-тримеры содержащие одновременно α -спирали и β -листы. Эти белки диссоциируют на мономеры, вставляют FLs в мембрану и олигомеризуются в постфузионные тримеры. Белки класса IV это реовирусные cell-cell фузогены, небольшие белки имеющие FLs, олигомеризация которых приводит к слиянию мембран (Harrison, 2008).

Гемагглютинин относится к белкам слияния класса I, в который, помимо него, входят белки слияния вируса парагриппа, ВИЧ и Эболы. Несмотря на то, что разнообразие вирусных семейств и аминокислотных последовательностей этих белков позволяет предположить их независимое происхождение, все они имеют сходный консервативный домен в центральном постфузионном шестиспиральном узле. Белки слияния первого класса в оболочке вируса исходно представлены тримерными метастабильными структурами и при получении сигнала к слиянию (связывание с рецептором, низкая pH и/или протеолитическое расщепление) претерпевают значительные необратимые структурные изменения, переходя в постфузионную конформацию. Для рефолдинга используется энергия, освобождаемая при слиянии мембран. Постфузионная конформация была описана как тример шпилек (Harrison, 2008; Welch et al, 2012; White, Helenius, Gething, 1982).

Во многих белках слияния первого класса протомеры формируют тример, образующийся путем изменения конформации пептида-предшественника, в результате которого происходит разделение на два фрагмента: трансмембранный домен на C-конце и гидрофобный участок слияния на N-конце. В префузионной конформации домен слияния скрыт (рис.4).

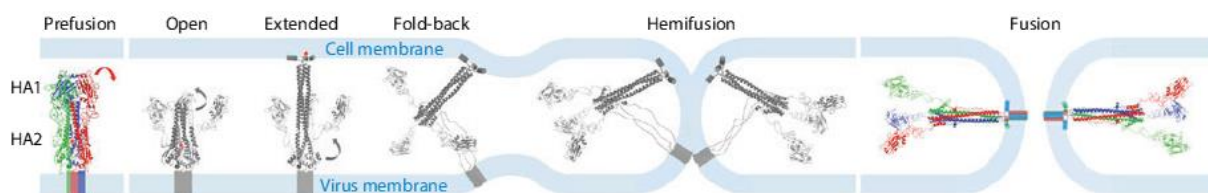


Рисунок 4. Модель изменения конформации белков слияния класса I на примере гемагглютинаина вируса гриппа (по: Ivanovic et al, 2013).

На начальной стадии гидрофобный пептид слияния вставляется в карман вблизи оси тримера. После связывания протона молекула принимает открытую конформацию, что позволяет высвободить фьюжн-пептид и встроить его в мембрану хозяина. Известны префузионное и постфузионное строение молекулы. Предполагаемые структурные переходы показаны серым цветом (Ivanovic et al, 2013).

Для смены конформации важны две области повторов, выше (HRB/HR2) и ниже (HRA/HR1) участка слияния. В постфузионной конформации, HRA-участки формируют центральный тримерный участок, HRB-участки располагаются напротив в антипараллельной ориентации, формируя шестиспиральный узел. Конформации белка после слияния напоминает тример протомеров, где каждая субъединица представляет собой шпилькоподобную структуру с участком слияния и трансмембранным доменом, расположенными аналогично расположению на протомерах. Строение этого участка является общим для белков слияния первого класса, в то время как другие детали структуры могут отличаться (Harrison, 2008; Welch et al, 2012; White, Helenius, Gething, 1982).

1.2. Препараты применяемые при лечении гриппа. Вирусные мишени для лекарственного вмешательства

Терапия при гриппе направлена на уничтожение вируса, устранение клинических проявлений, профилактику развития осложнений, контроль за состоянием сопутствующих заболеваний. К основным лекарственным средствам, используемым при лечении гриппа относятся противовирусные препараты: ингибиторы нейраминидазы, ингибиторы белка M2, интерфероны и индукторы интерферонов, а также патогенетические и симптоматические средства, выбор которых определяется особенностью и тяжестью клинических проявлений - антипиретики, муколитики, бронхолитики, сердечные средства, при гнойно-воспалительных осложнениях – антибактериальные препараты и другие по

показаниям (Таблица 2). К противовирусным средствам прямого действия (этиотропным) относятся производные адамантана, ингибиторы нейраминидазы, ингибиторы олигомеризации NP белка вируса гриппа.

Основные препараты для лечения и профилактики гриппа

Таблица 2.

Группы лекарственных препаратов	Механизм действия/группы	Препараты
Этиотропные препараты	Блокаторы ионного канала	Ремантадин/амантадин
	Ингибиторы нейраминидазы	Tamiflu™, Relenza™
	Ингибиторы протеаз	Амбен, эпсилон-аминокапроновая кислота
	Специфический шаперон гемагглютинаина	Арбидол
Препараты интерферона		Человеческий лейкоцитарный ИФН, ингарон, альфарона
Индукторы интерферона		Циклоферон, амиксин

(по: Деева, Мельникова, 2009)

I.2.1. Производные адамантана (амантадин, ремантадин)

Ремантадин (альфа-метил-1-адамантанметиламин) (рис. 5). Адамантан — химическое соединение, насыщенный трициклический мостиковый углеводород с формулой C₁₀H₁₆. Молекула адамантана состоит из трёх циклогексановых фрагментов, находящихся в конформации «кресло». Уникальность молекулы адамантана заключается в том, что она является жёсткой и практически свободной от напряжений одновременно (Несмеянов, 1969).

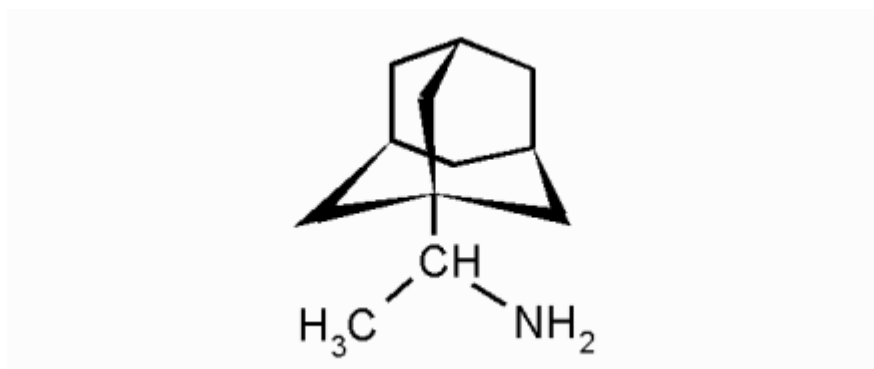


Рисунок 5. Строение молекулы ремантадина (по: Злыдников, Кубарь, Ковалева, 1981)

Назначение ремантадина больным гриппом, по данным многочисленных исследований, способствует нормализации температуры в более короткие сроки,

уменьшению явлений интоксикации, исчезновению катаральных симптомов, профилактике осложнений, уменьшению общей продолжительности заболевания. Важным свойством ремантадина является то, что значительное количество препарата накапливается в тканях верхних дыхательных путей – основном месте репродукции вируса гриппа. Была выявлена высокая противовирусная активность и широкий спектр действия препарата в отношении РНК содержащих вирусов, и в частности вируса гриппа типа А. В 1975 году ремантадин был разрешен для лечения гриппа типа А и по настоящее время применяется для лечения и профилактики гриппозной инфекции. Изучение профилактической эффективности ремантадина свидетельствует о достоверном снижении заболеваемости гриппом более чем на 50% и об ослаблении тяжести клинического течения заболевания у лиц, принимавших препарат с профилактической целью (Злыдников, Кубарь, Ковалева, 1981). Действие ремантадин направлено строго на вирус-специфическую мишень, локализованную в трансмембранной области минорного поверхностного белка М2 вируса гриппа (Киселев et al, 2000; Киселев, 2001). Вследствие подавления ремантадином активности ионного канала вируса гриппа останавливается поток протонов через мембраны вирионов и эндосом. В результате нарушается процесс диссоциации М1-белка (основного матриксного протеина) и не происходит высвобождения нуклеокапсида и, следовательно, его транскрипционной активации. Однако необходимо отметить, что высокая специфичность взаимодействия ремантадина с белком М2 вируса гриппа типа А становится причиной селекции резистентных вариантов вирусов. Для развития резистентности достаточно одиночных мутаций в гидрофобной области белка М2. При профилактическом применении ремантадина резистентность к препарату формируется реже, при терапевтическом – в 10 –20% случаев. Ремантадин совместим с препаратами интерферона, индукторами интерферона и симптоматическими препаратами. Эффективность химиотерапии гриппа только ремантадином удается повысить, если применять препарат сразу после появления характерных симптомов заболевания (1-е сутки). Проведение полного курса лечения позволяет максимально подавить репродукцию вируса и предотвратить распространение сформированных в процессе лечения резистентных вариантов. Ремантадин также снижает почкование вирусов, что приводит к снижению распространения вирусов заболевшими. Но по последним данным большинство стран отказались рассматривать препараты адамантанового ряда как средства для лечения и профилактики гриппа, в связи с развившейся резистентностью вирусов гриппа штаммов А у подавляющего (достигает 96%) числа населения (Киселев, 2001).

Известны противовирусные препараты прямого действия на репликацию вирусов гриппа, например препарат ремантадин (α -метил-1-адамантилметиламина гидрохлорид) и амантадин (1-аминоадамантан) (Davies et al, 1964). Данные соединения блокируют белок M2 вируса гриппа, препятствуя тем самым процессу расщепления гемагглютинина и слияния мембран вируса и лизосомальной вакуоли (Scholtissek et al, 1998). Механизм действия этих препаратов изучен достаточно полно. Белок M2 в виде тетрамера является ионным каналом, функционирующим в качестве протонного насоса. Известно, что данные препараты необратимо ингибируют M2-белок и тем самым останавливают поток протонов через мембраны вирионов, что необходимо для снижения pH, расщепления гемагглютинина и реализации его функции как фактора слияния вирусной и клеточной мембран. Ремантадин блокирует активность ионных каналов и нарушает тем самым процесс «раздевания» вируса (Cady et al, 2010).

Адамантановые препараты значительно дешевле и проще в производстве, чем коммерчески доступные ингибиторы нейраминидазы, что делает их более доступными для лечения и профилактики гриппа среди населения. Однако в настоящее время в результате широкого использования адамантановых препаратов, таких как ремантадин и амантадин (рис. 6), значительно утрачены их противовирусные свойства в отношении вирусов гриппа А.

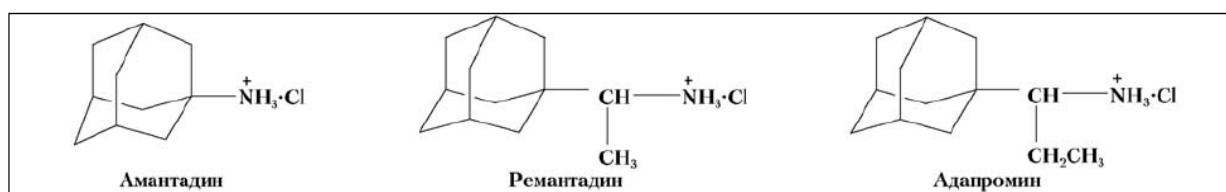


Рисунок 6. Противогриппозные препараты – производные адамантана (по: Flahault, 2006).

Потерю активности в основном связывают с мутацией в трансмембранном домене белка M2 вируса гриппа. Кроме хорошо известного ремантадина, сравнимой с ним противовирусной активностью обладает достаточно обширный класс соединений. Так, известно средство на основе дейтифорина (2-(1'-аминоэтил) бициклогептана, являющееся одним из наиболее интересных препаратов на основе природных бициклических каркасных соединений - борнанов (Патент RU 2448692) и введенных в медицинскую практику. Симметричные диимины на основе камфары, разделенные алифатической цепочкой, обладают сравнительно высокой активностью (индекс селективности от 40 до 89) (Патент РФ 2520967).

I.2.2. Дейтифорин

Дейтифорин можно отнести к категории перспективных карбоциклических противовирусных препаратов, поставив его в один ряд с широко известными противогриппозными средствами ремантадином, амантадином и адапромином. Дейтифорин содержит в молекуле бициклопептан, а его боковой фрагмент идентичен боковому фрагменту ремантадина. Лекарственный препарат дейтифорин представляет собой семь эндо- и экзо-форм с соотношением примерно 60 и 40% соответственно (Смирнов et al, 2008) (рис. 7). Сравнение дейтифорина с ремантадином свидетельствует, что замена адамантанового остова на норборнанный при идентичном боковом фрагменте приводит к расширению спектра противовирусной активности и уменьшению токсичности препарата. Дейтифорин относится к малотоксичным препаратам, его летальная доза для животных (ЛД₅₀ = 1265) примерно вдвое ниже, чем у ремантадина (ЛД₅₀ = 620) (Flahault et al, 2006).

Как противогриппозный препарат дейтифорин оказывает равноценный с ремантадином защитный эффект при гриппозной инфекции (Colizza et al, 2006) и способен не только эффективно подавлять вирусную репликацию, но и селективно воздействовать на вирусинфицированные клетки (Ferguson et al, 2006).

В основе противовирусного действия карбоциклических соединений лежит способность блокирования ряда этапов развития вируса в клетке хозяина, в основе которых лежит активность ионного канала М2-белка (Киселёв et al, 1994). Во-первых, блокируется процесс высвобождения нуклеиновой кислоты из вирусной частицы. Во-вторых, карбоциклические производные нарушают процесс почкования вирионов с последующим формированием и отделением их от клеточной мембраны (Киселёв et al, 1990).

Как и противогриппозные препараты из числа производных адамантана, при обработке до заражения дейтифорин снижает гемагглютинирующую активность инфицированных вирусом клеток и вызывает модификацию клеточных мембран, которые участвуют в последующем инфекционном процессе. Дейтифорин эффективен против вирусов гриппа типа А. Он снижает уровень репликации и инфекционность вирусов, не влияя при этом на синтез клеточных белков (Вотьяков et al, 1982).

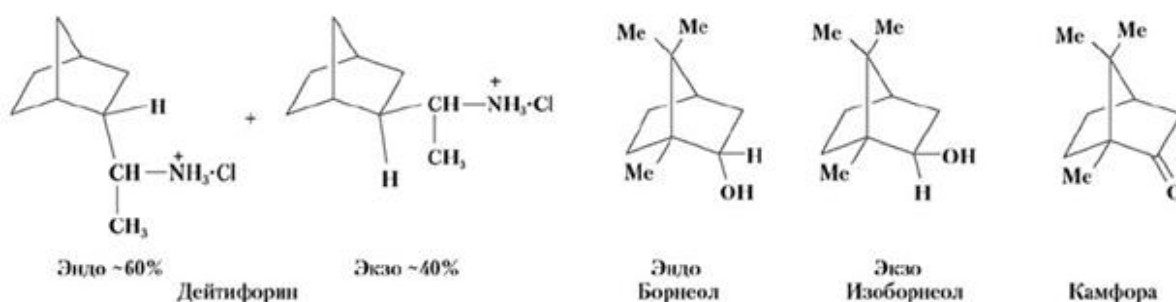


Рисунок 7. Дейтифорин и производные борнеола (по: Тандура et al, 2013).

I.2.3. Рибавирин

Рибавирин (рис. 8) обладает противовирусной активностью в отношении некоторых ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Рибавирин является антиметаболитом нуклеозидов и препятствует репликации геномов вирусов. Показана эффективность рибавирина против вирусов гриппа и многих вирусных геморрагических лихорадок. Рибавирин включается в РНК вместо аденина или гуанина и образует комплементарные пары с урацилом и цитозином, что вызывает мутации в РНК-зависимой репликации вирусов (Komadina et al., 2007) 5' моно-, ди- и трифосфаты рибавирина являются ингибиторами РНК-зависимых РНК-полимераз вирусов. Одним из его побочных эффектов является дозозависимая гемолитическая анемия, в запущенной форме вызывающая смерть пациента (в связи с чем требуется тотальный контроль показателей крови в процессе лечения). Рибавирин также является тератогеном для некоторых животных (Torriani FJ, 2004).

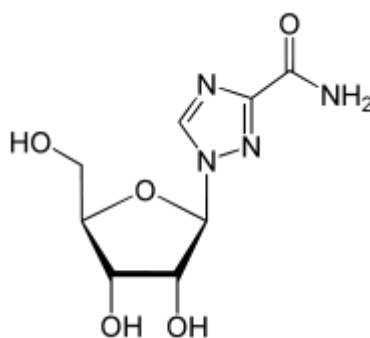


Рисунок 8. Строение молекулы рибавирина (по: Torriani FJ, 2004).

I.2.4. Ингибиторы нейраминидазы

Препараты этой группы избирательно подавляют активность нейраминидаз вирусов гриппа, что обеспечивает нарушение проникновения вируса в клетку, выход вириона из клетки по окончании цикла размножения и поражение новых клеток. В клинике используются несколько препаратов из этой группы, в частности осельтамивир (тамифлю) и занамивир (relenza). К ингибиторам нейраминидазы также возможно развитие резистентности (Ison, 2011).

I.2.5. Осельтамивир карбоксилат (Тамифлю)

Осельтамивир карбоксилат (тамифлю) (Рис. 9) – активный метаболит осельтамивира, являющийся селективным ингибитором нейраминидазы вирусов гриппа. Подавляя активность этого фермента, осельтамивир карбоксилат ингибирует высвобождение образующихся вирусов из клетки хозяина и, таким образом, ограничивает распространение инфекции. Осельтамивир применяют для лечения гриппа А или В у детей (в возрасте ≥ 1 года), подростков и взрослых, у которых симптомы сохраняются не более 2 дней. Лечение осельтамивиром следует начинать как можно раньше в течение первых 48 ч после появления симптомов и продолжать в течение 5 дней (Васильева et al, 1999).

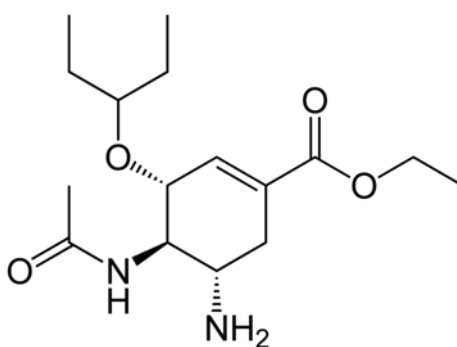


Рисунок 9. Структурная формула осельтамивира (по: Васильева et al, 1999).

I.2.6. Занамивир (Relenza)

Занамивир (relenza) (рис. 10) является высокоселективным ингибитором нейраминидазы, которая обеспечивает высвобождение вирусных частиц из инфицированной клетки и может ускорять проникновение вируса через слизистый барьер к поверхности эпителиальных клеток, тем самым, обеспечивая инфицирование других клеток дыхательных путей. Ингибирующая активность занамивира показана как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* и проявляется в отношении 9 подтипов нейраминидаз вирусов гриппа. Занамивир действует во внеклеточном пространстве, уменьшая воспроизведение обоих типов вируса гриппа А и В, тем самым предотвращая выброс вирусных частиц клеток из клеток поверхностного эпителия дыхательных путей. Применяется занамивир для лечения и профилактики инфекций, вызванных вирусом гриппа типа А и В, у взрослых и детей старше 5 лет. Занамивир предназначен только для ингаляционного введения в дыхательные пути с использованием прилагаемого ингалятора Дискхалер. Для достижения оптимального эффекта лечение должно быть начато как можно раньше (Васильева et al, 1999).

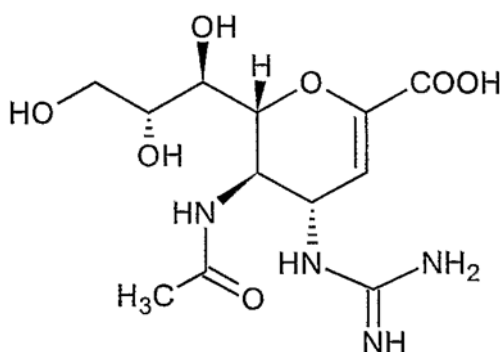


Рисунок 10. Структурная формула занамивир (по: Васильева et al, 1999).

I.2.7. Ингавирин

В последние годы для лечения гриппа применяются препараты из группы комбинированного механизма действия (ингавирин). Ингавирин, международное название: имидазолилэтанамида пентандиовой кислоты. Обладает высокой противовирусной активностью в отношении гриппа А (подтипы: H3N2, H1N1, H5N1), гриппа В и аденовируса. Противовирусный механизм действия ингавирина в отношении гриппа А реализуется путем подавления репродукции вируса на этапе ядерной фазы жизненного цикла, задержки миграции вновь синтезированного NP-белка вируса гриппа

из цитоплазмы в ядро. В отличие от существующих препаратов для лечения гриппа ингавирин действует на новую белковую мишень вируса – нуклеопротеин. ингавирин оказывает модулирующее действие на функциональную активность системы интерферона: вызывает повышение содержания интерферона в крови до физиологической нормы, стимулирует и нормализует сниженную α -интерферонпродуцирующую способность лейкоцитов крови, стимулирует γ -интерферонпродуцирующую способность лейкоцитов (Васильева et al, 1999).

I.2.8. Арбидол (Умифеновир)

Арбидол – производное индола – препарат близкий по строению к известному противовоспалительному препарату индометацину. Арбидол действует против ряда вирусов, вызывающих ОРВИ. Такую широкую активность препарата связывают с его способностью стимулировать синтез интерферона (Беляев et al, 1996). Помимо этого, арбидол действует на этапе репродукции вируса гриппа, ингибируя слияние липидной оболочки вируса с мембранами эндосом, происходящее внутри клеток в физиологических условиях (рН 7,4) при освобождении генетического материала вируса от наружных белков и липидной оболочки. Таким образом, арбидол, действуя на процессы слияния, ингибирует высвобождение вирусного нуклеопротеида. Клинические испытания арбидола продемонстрировали достаточно высокую эффективность препарата при его применении в период эпидемии для профилактики и лечения гриппа, вызванного вирусами гриппа типов А и В (Гагаринова et al, 1993; Киселева, Маринич, Соминина, 2003). Использование препарата с лечебной целью позволяет предотвратить тяжелое течение гриппа и других ОРВИ, сократить длительность течения инфекций, снизить частоту осложнений и обострений хронических заболеваний. Кроме того, важным качеством арбидола является то, что он совместим с другими противовирусными препаратами, антибиотиками и другими средствами традиционного лечения вирусных и бактериальных заболеваний (Ершов, 1996).

I.2.9. Интерфероны

Интерфероны занимают лидирующее положение среди используемых для иммунорегуляции препаратов, будучи чрезвычайно важным звеном в противостоянии организма вирусным инфекциям. Система интерферонов воздействует на различные стадии вирусной репликации, включая проникновение вируса в клетку, «раздевание»,

транскрипцию, трансляцию и выход зрелых вирионов из клетки. Необходимо отметить, что механизмы реализации противовирусного действия интерферонов I и II типов различны и аддитивны по противовирусной и противовоспалительной активности. Они, проявляя свои биологические свойства, взаимодополняют и взаимозаменяют друг друга в процессе реализации противовирусного ответа организма (Reuman, 2001). В экспериментах и клинической практике доказана эффективность интерферона альфа для профилактики гриппа и других ОРВИ при интраназальном применении. Современный препарат альфарона (интерферон альфа человеческий рекомбинантный) показал высокую эффективность в профилактике и лечении гриппа. Среди семейства препаратов на основе интерферонов одним из наиболее перспективных представляется ингарон (гамма-интерферон человеческий рекомбинантный). Его использование в терапии вирусных инфекций имеет важное значение для развития постинфекционного иммунитета, что принципиально отличает ингарон от других средств лечения гриппа. Препарат успешно прошел доклинические и клинические испытания и рекомендован в качестве профилактического и лечебного средства во время эпидемий гриппа. Необходимо отметить целесообразность комбинированного использования двух основных классов интерферонов – альфа и гамма при лечении гриппа, что определяется в первую очередь тем, что они – основные факторы противовирусной защиты организма и играют одну из ключевых ролей в противовирусной защите и контроле над инфекцией на протяжении всего инфекционного процесса, развивающегося в организме.

Многочисленные клинические исследования показали, что назначение препаратов интерферона, как I, так и II типа во время заболевания приводит к ослаблению тяжести течения инфекционного процесса, укорочению времени заболевания и предотвращению развития тяжелых осложнений. Учитывая тот факт, что высокопатогенные вирусы, в том числе вирусы гриппа, являются сильными ингибиторами интерферонов (Reuman, 2001), комбинированное применение альфа- и гамма-интерферонов для профилактики и лечения гриппа у человека предпочтительнее.

I.2.10. Индукторы интерферонов

Среди препаратов для лечения и профилактики вирусных инфекций продолжают привлекать особое внимание иммуномодуляторы и индукторы интерферонов (Dott, 1993; Ершов, 1998). Индукторы интерферона сочетают в себе ряд положительных качеств – высокий уровень и широкий спектр специфической активности, достаточную длительность противовирусного действия, высокий терапевтический индекс, способность

подавлять вирусную репродукцию (Dott, 1993; Романцов, 1997). Среди индукторов интерферонов первого поколения большой интерес представляют производные акридонуксусной кислоты, являющиеся слабыми интеркаляторами, и, по-видимому, взаимодействие с ДНК/РНК можно считать одним из основных механизмов их действия. Низкомолекулярный синтетический индуктор интерферона, относящийся к классу акридонов, циклоферон (камедон, неовир) обладает широким спектром противовирусной активности, эффективен в отношении гриппа и других ОРВИ, вирусных гепатитов, ряда инфекций, поражающих нервную систему (клещевой энцефалит, клещевой боррелиоз), герпес-вирусной инфекции (Киселев, 1998; Киселев et al, 2000). Циклоферон индуцирует синтез раннего альфа-интерферона. Ввиду низкой токсичности соединения возможно его как пероральное, так и парентеральное использование. Циклоферон, обладая высокой степенью биодоступности, проникает через гематоэнцефалический барьер, что позволяет назначать его при нейроинфекциях. Вместе с тем ошибочным был бы вывод, что только с помощью циклоферона можно эффективно лечить вышеперечисленные заболевания (Киселев et al, 2000). Практика последовательного применения противовирусных препаратов, интерферонов и индукторов интерферона является наиболее эффективной при лечении вирусных инфекций. В острый период заболевания необходимо применять прямые ингибиторы репликации, снижая тем самым вирусную нагрузку. Однако после купирования острых явлений и вирусемии возможно применение индукторов интерферонов для стимуляции процессов активации иммунитета и сероконверсии.

При изучении клинической эффективности циклоферона в терапии неосложненного гриппа было показано существенное снижение проявлений интоксикации, катарального синдрома, лихорадки. Также была подтверждена его эффективность в предупреждении развития постгриппозных осложнений. Несомненно важны свойства циклоферона в отношении быстрой индукции интерферона (2 часа), что позволяет рекомендовать его в качестве дополнительного препарата для лечения острой фазы вирусной инфекции. Целесообразно также назначать препарат в качестве средства экстренной профилактики острых респираторных вирусных заболеваний и гриппа в период эпидемического подъема заболеваемости.

Другой низкомолекулярный индуктор эндогенного интерферона – амиксин относится к синтетическим соединениям класса флуоренов. Многообразие биологической активности амиксина обусловлено его иммуномодулирующим (индукция интерферона) действием (Киселев, 1998). Этим объясняется широкий спектр его противовирусной активности при лечении гриппа, герпеса, цитомегаловирусной инфекции, а также клиническая эффективность при рассеянном склерозе, некоторых опухолях и различных

хронических воспалительных заболеваниях, ассоциированных с вторичными иммунодефицитами. При изучении эффективности амиксина в ходе лечения гриппозной инфекции у больных было выявлено существенное снижение продолжительности проявления симптомов заболевания у лиц, получавших препарат, по сравнению с плацебо. Кроме того, амиксин при лечении ОРВИ способствует снижению частоты развития осложнений при гриппе (Селькова, 2000).

Разработка противовирусных препаратов является одним из наиболее актуальных направлений в современной фармакологии. Кризис этих исследований со всей очевидностью проявился в последнее время, когда практическое здравоохранение многих стран оказалось лицом к лицу с беспрецедентной смертностью больных от атипичной пневмонии, вызванной коронавирусом SARS, и от птичьего гриппа в странах Юго-Восточной Азии.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

II.1. Химические соединения

Соединения, используемые в данном исследовании, были синтезированы в Новосибирском институте органической химии (НИОХ СО РАН). Строение и чистота соединений были охарактеризованы при помощи ядерно-магнитного резонанса и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве препарата сравнения был взят осельтамивира фосфат - Тамифлю (серия: F0148; годен до: 10.2020; производитель: Ф. Хоффман-Ля Рош Лтд., Швейцария; лекарственная форма: капсулы; фармакологическая группа: противовирусное средство).

II.2. Животные

Вид животных:	<i>Mus musculus</i> (мышь домовая). Нелинейные, альбиносы
Микробиологический статус	Конвенциональные
Источник получения:	Питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская область
Возраст к началу исследования:	8-10 недель
Вес животных к началу исследования:	16-18 г
Количество самцов:	0
Количество самок:	90

II.2.1. Адаптация и отбор животных для исследования

Лабораторные животные до начала исследования в течении 7 дней содержались группами по 10 особей в клетке для адаптации к новым условиям содержания. Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были.

Животных распределялись по группам случайным образом, но так, чтобы разброс по исходной массе не превышал $\pm 10\%$.

II.2.2. Содержание животных

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009, а также с правилами, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

В период акклиматизации и эксперимента мыши были размещены в поликарбонатных клетках BENEX а.с., Чешская республика, тип Т3А, S=800 см², группами по 10 особей, на древесных гранулах. Клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Площадь пола в клетке содержания для одного животного составила 80 см² (при минимально допустимой площади 40 см²).

Кормление животных проводилось на основании «Санитарных правил по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных МЗ СССР 06.07.73 г. и Приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.

Корм для содержания лабораторных животных, рецепт № ПК-120-2_173000 «Лабораторкорм» (Москва), приготовленный по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г., давали ad libitum (без ограничений) через кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки.

Так же без ограничений в стандартных поилках со стальными крышками-носиками животным давалась вода (очищенная и нормированная по органолептическим свойствам, по показателям pH, сухого остатка, восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов и нитритов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов на основании ГОСТ 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества»).

В качестве подстила использовали древесные гранулы (ООО «Биосфера», Санкт Петербург, Россия).

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18°-22° С и относительной влажности воздуха 50-70%). Устанавливался режим вытяжной вентиляции, обеспечивающий смену воздуха около 15 объемов помещения в час.

Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не происходило.

II.2.3. Способ введения препаратов и выбор доз

Аликвоты препаратов разводили в физиологическом растворе (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь, серия 7961114, срок годности до 12.2019). Для растворения препаратов навеску субстанции смешивали с необходимым объемом раствора и инкубировали при помешивании в течение 10 мин при комнатной температуре. После растворения проводили контроль кислотности раствора при помощи индикаторной бумаги и при необходимости доводили pH до 7-8 при помощи 1N соляной кислоты, после чего из полученных маточных растворов готовили растворы соответствующей концентрации. Препарат сравнения растворяли при комнатной температуре. В качестве плацебо животным вводили физиологический раствор в том же объеме и режиме, что и исследуемые препараты.

Путь введения препаратов животным – внутрижелудочный, который является аналогом перорального введения для человека, выбран в соответствии с таковым предусмотренным для клинического применения препаратов.

Доза исследуемых препаратов была выбрана 100 мг/кг. Тамифлю применяли в дозе 25 мг/кг/сут., что является мышинным аналогом доз, рекомендованных к клиническому применению у человека.

II.3. Вирусы и клетки

В работе использовали штаммы вируса гриппа, полученный из Музея вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» Министерства здравоохранения РФ: A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Владивосток/2/09 (H1N1) и B/Lee/40.

II.3.1. Культивирование и хранение вирусных штаммов

Вирусы гриппа культивировали в 10-11 дневных растущих куриных эмбрионах (РКЭ), вводя в аллантоисную полость 10^4 - 10^6 50% инфекционных доз (ИД₅₀) на 0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ). Вирус культивировали 48 часов при +37°C. Аликвоты ВАЖ хранили при температуре –20°C и использовали для экспериментов на клетках.

II.3.2. Культивирование вирусов и тестирование препаратов на культуре клеток MDCK

Вirus выращивали на культуре клеток MDCK (перевиваемая культура почечного эпителия собаки), полученной из лаборатории клеточных культур ФГБУ «НИИ Гриппа». Культуру клеток выращивали в 96-луночных планшетах на среде DMEM (www.biolot.ru, Артикул: 1.3.9.2), с добавлением 2% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для этого монослойную культуру клеток MDCK выращивали в 96-луночных планшетах (Costar, USA) на среде DMEM с добавлением 2% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота в течение 24 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Перед инфицированием клетки отмывали два раза по 5 минут средой DMEM. Десятикратные разведения вируса (10^{-1} — 10^{-6}) делали в поддерживающей среде, состоящей из среды DMEM с добавкой 1 мкг/мл трипсина и 0,01 мг/мл ципрофлоксацина.

Из каждого препарата готовили серию трехкратных разведений, начиная с 2 ЦТД 50. После инкубации клеток при 37°C в атмосфере 5% CO₂ с 0,1 мл каждой из концентраций в течение часа в лунку заливали 0,1 мл вирусосодержащей среды. Затем клетки с препаратом и вирусом инкубировали двое суток при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации определяли титр вируса при помощи реакции гемагглютинации.

II.3.3. Реакция гемагглютинации (РГА)

Для определения наличия вируса в культуральной среде ставили РГА в круглодонных планшетах для иммунологических реакций («Медполимер»). Для этого культуральную среду переносили из плоскодонных планшетов с клетками в соответствующие лунки круглодонного планшета в количестве 0,1 мл на лунку, после чего вносили равное количество 1% суспензии куриных эритроцитов на физиологическом растворе. Реакцию учитывали через 30-40 минут при комнатной температуре. За инфекционный титр вируса принимали наибольшее разведение вируса, способное вызвать положительную реакцию гемагглютинации.

Каждую концентрацию соединений тестировали в двух параллелях. Каждый опыт повторяли 2-3 раза. На основании полученных данных рассчитывали значение ИД₅₀ для каждого соединения, т.е. концентрацию препарата снижающего титр вируса вдвое по сравнению с контролем.

II.3.4. Исследование токсичности препаратов на клеточной культуре MDCK

Все синтезированные соединения тестировали на токсичность в отношении клеток MDCK в культуре. Для этого была приготовлена серия трёхкратных разведений препаратов на среде MEM от 1000 до 4 µg/ml. Растворенные препараты вносили в лунки планшетов с клетками и инкубировали в термостате 48 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для оценки токсичности препаратов использовался метод МТТ (микротетразолиевый тест). После 48 часов инкубации с препаратом к клеткам добавляли раствор МТТ (3-(4,5-диметил тиазол-2)-2,5-дифенил тетразолиум бромид, ICN Biomedicals Inc., USA) в концентрации 0,5 мг/мл (по 0,1 мл на лунку) и инкубировали в течение часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂, после чего раствор удаляли и растворяли осадок в 0,1 мл 96% спирта. Через 5 минут измеряли оптическую плотность в лунках на спектрофотометре Victor2 1420 (Perkin Elmer) при длине волны 535 нм. На основании полученных данных рассчитывали ЦТД 50 (50% цитотоксическую концентрацию препаратов), то есть концентрацию препарата, разрушающую 50% клеток в культуре (снижающую оптическую плотность в лунках в два раза по сравнению с контролем).

II.4. Оценка протективной активности производных камфоры на модели летальной гриппозной инфекции

Опыт был организован по следующей схеме:

1. Интраназальное инфицирование животных вирусом под легким эфирным наркозом в объеме 50 мкл на мышь.
2. Пероральное введение препаратов 1 раз в сутки в объеме 0,2 мл по лечебной схеме: через 1, 2, 3, 4 и 5 суток после заражения.

Препараты в объеме 200 мкл вводили перорально при помощи желудочного зонда. Противовирусную активность соединений учитывали по повышению выживаемости мышей в опыте (вирус + препарат) по сравнению с контролем (вирус + физиологический раствор, в качестве плацебо).

Каждый препарат исследовался на группе из 10 мышей. Контрольная группа составляла также 10 мышей.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 10 дней - срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается гибель животных. Ежедневно

фиксируют гибель животных в контрольных и подопытных группах. На основании полученных показателей выживаемости в каждой группе рассчитывали:

1. Процент гибели: M_r - отношение числа павших за 10 дней животных к общему числу зараженных животных в группе,
2. Индекс защиты: I_P - отношение разницы доли погибших животных в контрольной и подопытной группах к доле погибших животных в контрольной группе в соответствии со следующими формулами:

$M_r = M/N_t$, где M – число животных в группе, павших в течение 10 дней после заражения;
 N_t – общее число павших животных в группе;

$I_P = ((M_c - M_e)/M_c) \times 100\%$, где M_c и M_e – доля погибших животных в контрольной и опытной группах соответственно.

II.5. Изучение морфогенеза гриппозной инфекции в условиях применения камфецина

Опыт был организован по следующей схеме:

1. Интраназальное инфицирование животных вирусом под легким эфирным наркозом в объеме 50 мкл на мышь.
2. Пероральное введение препаратов 1 раз в сутки в объеме 0,2 мл по лечебной схеме: через 1, 2, 3, 4 и 5 суток после заражения.

Препараты в объеме 200 мкл вводили перорально при помощи желудочного зонда.

Для проведения исследования уровня активности экспериментальных препаратов были сформированы группы животных (таблица 3).

Схема тестирования препаратов

Таблица 3.

Вирус	Количество животных		
	Камфецин, 100 мг/кг	Тамифлю, 25	Плацебо
B/Lee/40	10	0	10
A/Владивосток/2/09	10	10	10

Через 5 и 10 суток после заражения мышей вскрывали и оценивали степень поражения легких. Для вскрытия брали по 5 животных из каждой группы. После оценки объема поражения легкие использовали для приготовления гистологических препаратов, на основе которых получали представление об изменении структуры органов, вызванном инфекцией.

II.6. Получение гистологических срезов и проведение гистологической окраски

Для получения гистологических срезов легкие помещали в раствор 10% формалина на фосфатном буфере на 24 часа. Далее образцы промывали в течение ночи в проточной воде, затем вносили в 50% спирт на сутки. Далее в 70% спирт на сутки, после чего дважды – в 96% спирт на сутки. Далее образцы дважды помещали на 1 час в хлороформ, после чего на 16 часов – в смесь хлороформа с парафином при температуре 37°C, после чего образцы дважды переносили в парафин на сутки при 56°C. После проводки образцы ткани помещали в жидкий парафин и оставляли на три часа при комнатной температуре. Из полученной массы вырезали блоки, содержащие исследуемые образцы и, с помощью микротомы, готовили из них срезы толщиной 4 мкм.

Для гистологической окраски стекла с нанесенными срезами последовательно выдерживали в следующих реактивах: ксилол – 5 мин (2 раза), смесь спирт/ксилол (1:1) – 5 мин, 96% спирт – 5 мин (2 раза), 50% спирт – 5 мин, дистиллированная вода – 1 мин, гематоксилин – 3 мин, вода – 5 мин, дистиллированная вода – 10 с, эозин – 15 с, 50% спирт – 5 мин, 96% спирт – 5 мин (2 раза), ксилол – 5 мин (2 раза).

На окрашенный срез наносили каплю канадского бальзама, растворенного в ксилоле. Сверху накладывали покровное стекло, контролируя равномерность распределения бальзама при помощи препаровальной иглы. Заключенные срезы выдерживали сутки при комнатной температуре и исследовали под световым микроскопом.

II.7. Электронное микроскопирование

Клетки MDCK инкубировали с вирусосодержащим материалом в течение 1 часа при 37°C. Несвязавшийся вирус отмывали 2 раза стерильной средой DMEM и вносили в лунки препараты в необходимых концентрациях. Через 1 и 4 часа после заражения контрольные и опытные культуры клеток фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида на среде DMEM (pH 7,2), центрифугировали 20 мин при 2000 об./мин и фиксировали 2,5% раствором OsO₄. Клетки обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон/аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Austria), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Japan) при инструментальном увеличении x5000 - 50000.

II.8. Статистический анализ и расчётные формулы

Значения ЦТД50 и ЭД50 рассчитывали с помощью регрессионного анализа Microsoft Excel. На основании полученных данных рассчитывали химиотерапевтический индекс (ХТИ), который также называют индексом селективности (SI) – величина, выражающая отношение 50 % цитотоксической дозы химиотерапевтического средства к его 50 % ингибирующей дозе. Для каждого из препаратов рассчитывали ХТИ по формуле: $\text{ЦТД50} / \text{ЭД50} = \text{ХТИ}$, где ЦТД50 – цитотоксическая доза, ЭД50 – эффективная доза, ХТИ – химиотерапевтический индекс.

Достоверность различий в смертности животных определяли с помощью точного двустороннего критерия Фишера. Достоверными считали различия, при которых значение F не превышало 0,05.

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ

III.1. Изучение вирусингибирующих свойств производных камфары в культуре клеток

Несмотря на то, что ни один из изомеров камфары не обладает значимой противовирусной активностью и цитотоксичностью, при замене атома кислорода на атом азота и присоединению к нему различных функциональных групп, можно получить различные соединения, некоторые из которых, сохраняя низкую токсичность, присущую исходному соединению, обладают высокой противовирусной активностью. Их общая формула изображена на рисунке 11.

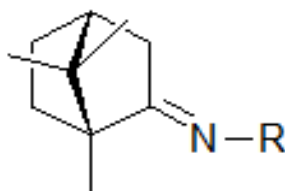






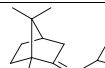
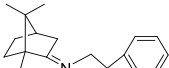
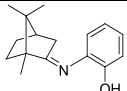
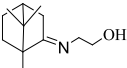
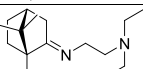
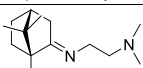
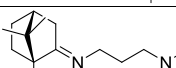
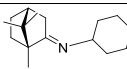
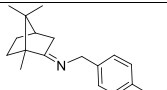
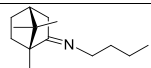
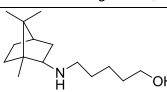
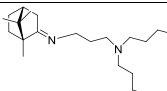
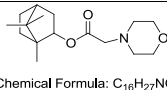
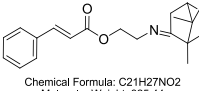
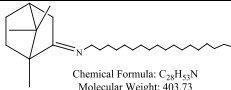
Рисунок 11. Общая структурная формула исследуемых производных камфары. R – любая функциональная группа

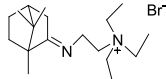
Нами было проведено исследование изомеров камфары и ряда ее иминопроводных, включая группы несимметричных иминов и их симметричных аналогов. Были определены их 50% цитотоксическая доза и 50% эффективная доза. Эффективная доза определялась по результатам реакции гемагглютинации, цитотоксическая – с помощью микротетразолиевого теста. На основании полученных данных как отношение этих показателей был подсчитан химиотерапевтический индекс. В таблицах 4 и 5 представлены данные по противовирусной и токсической активности исследуемых препаратов.

Противовирусная активность несимметричных иминопроводных камфары в отношении вируса гриппа типа А по результатам реакции гемагглютинации и микротетразолиевого теста

Таблица 4.

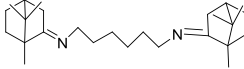

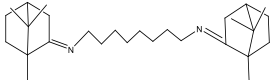
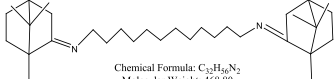
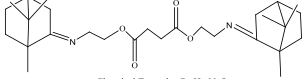
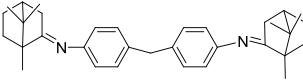
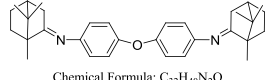
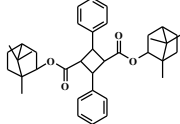
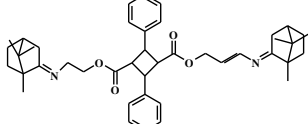
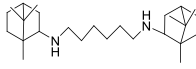
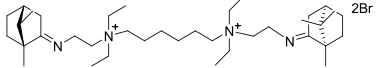
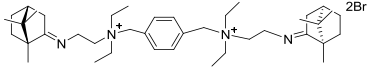
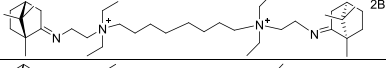
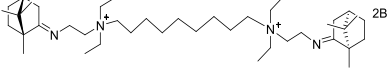
№ препарата	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
1084	Ch-1	 Chemical Formula: C ₁₀ H ₁₆ O Molecular Weight: 152,23	>3284,5	>3284,5	1

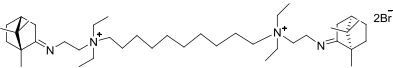
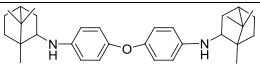
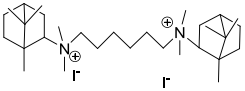
1074	Ch-2	 Chemical Formula: C ₁₀ H ₁₆ O Molecular Weight: 152,23	3284,5±224,1	997,2±81,1	3
1085	Ch-3	 Chemical Formula: C ₁₀ H ₁₆ O Molecular Weight: 152,23	>3284,5	>3284,5	1
1072	Ch-4	 Chemical Formula: C ₁₀ H ₁₆ O Molecular Weight: 152,23	>3284,5	3284,5±214,2	1
1383	AS-161	 Chemical Formula: C ₁₃ H ₂₁ N Molecular Weight: 191,31	1662,2±145,4	590,7±44,8	3
1386	Ya-263	 Chemical Formula: C ₁₈ H ₂₅ N Molecular Weight: 255,40	368,1±32,3	14,9±1,8	25
1472	Ya-343-4	 Chemical Formula: C ₁₈ H ₂₅ N Molecular Weight: 255,40	58.4±3.1	>41.2	1
1007	Ya-213	 Chemical Formula: C ₁₄ H ₂₃ N Molecular Weight: 207,35	2425,4±215,6	9,2±0,5	263
1008	Ya-187	 Chemical Formula: C ₁₈ H ₂₉ N Molecular Weight: 257,47	722,4±58,8	25,6±3,0	28
1009	As-106	 Chemical Formula: C ₁₈ H ₂₉ N Molecular Weight: 257,47	2111,7±154,3	39,1±4,1	54
1392	Ya-248	 Chemical Formula: C ₁₈ H ₂₉ N Molecular Weight: 257,47	>2115,1	21,2±2,0	100
1569	Ya-372-10	 Chemical Formula: C ₁₆ H ₂₇ N Molecular Weight: 233,39	>1285,4	55,3±6,4	23
2273	Ya-356-8-5	 Chemical Formula: C ₁₈ H ₂₅ NO Molecular Weight: 271,40	457,9±42,4	4,4±0,3	104
2274	Ya-264	 Chemical Formula: C ₁₄ H ₂₅ N Molecular Weight: 207,35	1447,7±132,5	14,5±1,3	100
1380	AS-136	 Chemical Formula: C ₁₉ H ₃₃ NO Molecular Weight: 283,49	304,5±21,4	14,2±2,3	21
1563	Ya-371-13	 Chemical Formula: C ₂₁ H ₃₇ N Molecular Weight: 313,53	346,3±31,8	26,2±2,1	13
1557	Ya-362-21	 Chemical Formula: C ₁₈ H ₂₇ NO ₃ Molecular Weight: 281,39	579,3±44,4	7,1±0,4	82
1394	AS-122-2-16	 Chemical Formula: C ₂₁ H ₂₇ NO ₂ Molecular Weight: 325,44	149,6±12,7	24,0±2,6	6
1571	AS-209	 Chemical Formula: C ₂₉ H ₅₁ N Molecular Weight: 403,73	>743,1	743,1±0,0	1

1012	Ya-201		1781,8±99,6	141,0±11,0	13
------	--------	---	-------------	------------	----

Противовирусная активность симметричных иминопроизводных камфары
в отношении вируса гриппа типа А по результатам реакции
гемагглютинации и микротетразолиевого теста

Таблица 5.

№ препарата	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
839	AS-32	 Chemical Formula: C ₂₆ H ₄₄ N ₂ Molecular Weight: 384,64	759,9±41,3	10,7±1,1	71
842	AS-10	 Chemical Formula: C ₂₇ H ₄₆ N ₂ Molecular Weight: 398,67	681,0±59,4	12,3±2,0	55
992	AS-99	 Chemical Formula: C ₂₉ H ₄₈ N ₂ Molecular Weight: 412,69	390,1±25,6	24,2±3,1	16
996	AS-82	 Chemical Formula: C ₂₇ H ₄₆ N ₂ Molecular Weight: 468,80	2218,7±154,8	45,1±3,9	49
997	YA-214	 Chemical Formula: C ₂₉ H ₄₈ N ₂ O ₄ Molecular Weight: 472,66	376,6±26,1	14,6±1,9	26
843	AS-47	 Chemical Formula: C ₃₃ H ₄₂ N ₂ Molecular Weight: 466,70	605,3±54,0	229,3±26,2	3
848	AS-19	 Chemical Formula: C ₃₂ H ₄₀ N ₂ O Molecular Weight: 468,67	734,0±65,1	379,8±38,6	2
1331	AS-145		879,0±76,5	112,5±10,8	8
1200	AS-137-11		451,2±40,3	168,4±14,7	3
840	Я-106	 Chemical Formula: C ₂₆ H ₄₈ N ₂ Molecular Weight: 388,67	5,4±0,3	0,8±0,1	7
1014	Ya-177		1040,5±79,1	48,0±5,8	22
1015	As-70		539,5±38,8	16,9±2,0	32
1016	As-104		864,6±66,0	22,0±2,3	39
1017	As-107		643,6±42,9	52,5±6,2	12

1018	As-105		209,6±12,7	37,2±4,0	6
851	AS-22	 Chemical Formula: C ₃₃ H ₄₄ N ₂ O Molecular Weight: 472,70	>634,7	208,4±16,6	3
841	AS-45	 Chemical Formula: C ₃₀ H ₅₈ I ₂ N ₂ Molecular Weight: 700,60	102,8±8,5	>142,7	1


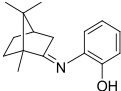
На основании полученных результатов, и исходя из соображений скорости синтеза соответствующего соединения и его доступности, для дальнейшего изучения было отобрано вещество с максимальным химиотерапевтическим индексом – 263 (№ 1007, камфецин), а также соединения с химиотерапевтическим индексом более 100 - №2274 и №2273.

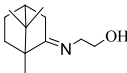
III.1.2. Сравнительный анализ эффективности исследованных препаратов

Как видно из таблиц 4 и 5, в результате присоединения различных радикалов к иминогруппе, свойства получившегося соединения могут варьировать. Несмотря на то, что сама по себе камфара обладает очень низкой противовирусной активностью (эффективная доза >3284,5 мМоль), ее иминопроизводные показывают эффективность значительно, иногда на несколько порядков, превосходящую активность исходного соединения. Что делает получившееся соединение перспективным лекарственным препаратом. С другой стороны иминопроизводные могут проявлять значительно более высокую цитотоксичность. В отдельных случаях, цитотоксическая доза может быть сопоставима с вирусингибирующей, что делает невозможным использование соединения в лекарственных целях, несмотря на его высокую противовирусную активность (Таблица 6).

Сравнение противовирусной активности и цитотоксичности камфары и ее иминопроизводных

Таблица 6.

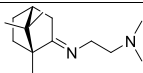
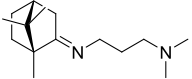
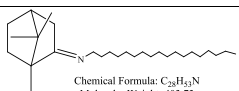
№ препарата	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
1084	Ch-1	 Chemical Formula: C ₁₀ H ₁₆ O Molecular Weight: 152,23	>3284,5	>3284,5	1
1472	Ya-343-4		58.4±3.1	>41.2	1

1007	Ya-213		2425,4±215,6	9,2±0,5	263
------	--------	---	--------------	---------	-----

Анализ влияния радикалов на противовирусную активность и цитотоксичность иминопроводных камфары представлен в таблицах 7-13.

Влияние длины алифатического линкера на противовирусную активность и цитотоксичность иминопроводных камфары

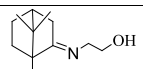
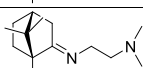
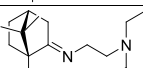
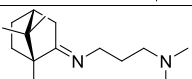
Таблица 7.

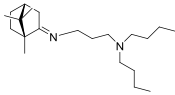
№ препарата	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
1009	As-106		2111,7±154,3	39,1±4,1	54
1392	Ya-248	 <div>Chemical Formula: C₁₅H₂₈N₂ Molecular Weight: 236,40</div>	>2115,1	21,2±2,0	100
1571	AS-209	 <div>Chemical Formula: C₂₈H₄₄N Molecular Weight: 403,73</div>	>743,1	743,1±0,0	1

Как видно из таблицы 7, удлинение углеводородной цепочки, присоединенной к азоту, на один атом углерода не оказывает заметного влияния на токсичность, но при этом почти вдвое повышает эффективность препарата. В то же время, дальнейшее удлинение цепочки приводит к резкому увеличению токсичности препарата и снижению его противовирусной активности.

Влияние строения аминогруппы, расположенной на конце алифатического линкера на противовирусную активность и цитотоксичность иминопроводных камфары.

Таблица 8.

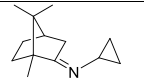
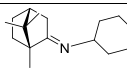
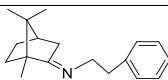
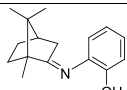
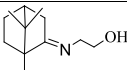
№ препарата	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
1007	Ya-213		2425,4±215,6	9,2±0,5	263
1009	As-106		2111,7±154,3	39,1±4,1	54
1008	Ya-187		722,4±58,8	25,6±3,0	28
1392	Ya-248	 <div>Chemical Formula: C₁₅H₂₈N₂ Molecular Weight: 236,40</div>	>2115,1	21,2±2,0	100

1563	Ya-371-13	 Chemical Formula: $C_{27}H_{40}N_2$ Molecular Weight: 320,56	$346,3 \pm 31,8$	$26,2 \pm 2,1$	13
------	-----------	--	------------------	----------------	----

Замена последнего атома углеродной цепочки на разветвленную аминогруппу значительно увеличивает токсичность и незначительно изменяет активность, причем эти изменения выражены тем сильнее, чем больше разветвлена аминогруппа и длиннее исходная углеродная цепочка (Таблица 8).

Влияние циклических и гидроксильных заместителей на противовирусную активность и цитотоксичность иминопроизводных камфары

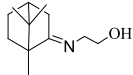
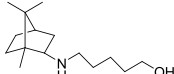
Таблица 9.

№	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
1383	AS-161	 Chemical Formula: $C_{13}H_{21}N$ Molecular Weight: 191,31	$1662,2 \pm 145,4$	$590,7 \pm 44,8$	3
1569	Ya-372-10	 Chemical Formula: $C_{16}H_{27}N$ Molecular Weight: 233,39	$>1285,4$	$55,3 \pm 6,4$	23
1386	Ya-263	 Chemical Formula: $C_{18}H_{25}N$ Molecular Weight: 255,40	$368,1 \pm 32,3$	$14,9 \pm 1,8$	25
1472	Ya-343-4		$58,4 \pm 3,1$	$>41,2$	1
1007	Ya-213		$2425,4 \pm 215,6$	$9,2 \pm 0,5$	263

Присоединение к иминогруппе углеродных колец увеличивает токсичность и активность препарата. При этом, чем больше атомов в кольце заместителя, тем сильнее выражены эти эффекты. Присоединение к иминогруппе бензольного кольца резко увеличивает токсичность и повышает активность, по сравнению с циклоалкановыми заместителями. Добавление к бензольному заместителю ОН-группы уменьшает активность соединения и очень сильно увеличивает его токсичность. При этом присоединение гидроксильной группы напрямую к углеводородной цепи дает обратный эффект (Таблица 9).

Влияние длины алифатического линкера на противовирусную активность и цитотоксичность иминопроизводных камфары, имеющих гидроксильную группу

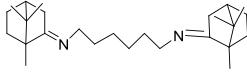
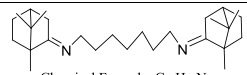
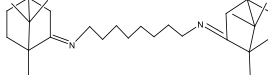
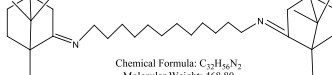
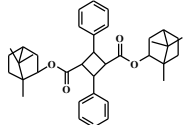
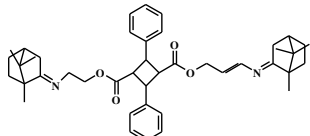
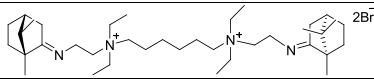
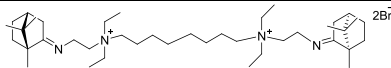
Таблица 10.

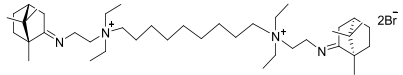
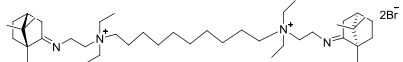
№	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
1007	Ya-213		2425,4±215,6	9,2±0,5	263
1380	AS-136	 Chemical Formula: C ₁₉ H ₃₀ NO Molecular Weight: 239,40	304,5±21,4	14,2±2,3	21

Для соединений с присоединёнными к иминогруппе углеводородными цепями, у которых на конце располагались гидроксильные группы в качестве радикала было отмечено, что при удлинении цепочки значительно увеличивается токсичность, но противовирусная активность увеличивается при этом незначительно (Таблица 10).

Влияние длины алифатического линкера на противовирусную активность и цитотоксичность симметричных иминопроизводных камфары

Таблица 11.


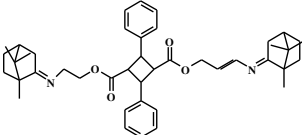
№	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
839	AS-32	 Chemical Formula: C ₂₆ H ₄₄ N ₂ Molecular Weight: 384,64	759,9±41,3	10,7±1,1	71
842	AS-10	 Chemical Formula: C ₂₇ H ₄₆ N ₂ Molecular Weight: 398,67	681,0±59,4	12,3±2,0	55
992	AS-99	 Chemical Formula: C ₂₈ H ₄₈ N ₂ Molecular Weight: 412,69	390,1±25,6	24,2±3,1	16
996	AS-82	 Chemical Formula: C ₃₀ H ₅₂ N ₂ Molecular Weight: 468,80	2218,7±154,8	45,1±3,9	49
1331	AS-145		879,0±76,5	112,5±10,8	8
1200	AS-137-11		451,2±40,3	168,4±14,7	3
1014	Ya-177	 2Br ⁻	1040,5±79,1	48,0±5,8	22
1016	As-104	 2Br ⁻	864,6±66,0	22,0±2,3	39

1017	As-107		643,6±42,9	52,5±6,2	12
1018	As-105		209,6±12,7	37,2±4,0	6

В симметричных соединениях (когда две камфорных группы соединены между собой различными линкерами) удлинение линкерной цепочки приводит к повышению токсичности и снижению активности. Резкое снижение токсичности у препарата № 996, по-видимому, вызвано снижением растворимости и может не соответствовать действительности, поскольку может не поступать в клетку хозяина в полном объеме (Таблица 11).

Влияние строения линкера на противовирусную активность и цитотоксичность симметричных иминопериовых камфары

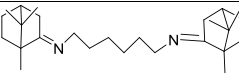
Таблица 12.

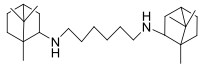
№	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
842	AS-10	 Chemical Formula: C ₂₇ H ₄₆ N ₂ Molecular Weight: 398,67	681,0±59,4	12,3±2,0	55
1200	AS-137-11		451,2±40,3	168,4±14,7	3

При замене атомов азота у двух молекул камфоры на атомы кислорода и объединении этих молекул коротким линкером, в центре которого расположен циклобутан с присоединёнными к нему двумя бензольными кольцами в пара-положении, а к атомам углеродов в линкере присоединены два атома кислорода наблюдается увеличение токсичности препарата в полтора раза при более чем десятикратном снижении противовирусной активности (Таблица 12).

Влияние двойной связи азотного заместителя на противовирусную активность и цитотоксичность симметричных иминопериовых камфары

Таблица 13.

№	шифр	Структура	Показатели биологической активности		
			CTD ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мкМ	SI
839	AS-32	 Chemical Formula: C ₂₆ H ₄₄ N ₂ Molecular Weight: 384,64	759,9±41,3	10,7±1,1	71

840	Я-106	 Chemical Formula: C ₂₆ H ₄₈ N ₂ Molecular Weight: 388,67	5,4±0,3	0,8±0,1	7
-----	-------	---	---------	---------	---

При замене иминогруппы заместителя камфары на аминогруппу наблюдается более чем стократное увеличение токсичности при десятикратном увеличении активности (Таблица 13).

Симметричные иминопроизводные камфары проявляли, в среднем, одинаковую активность с несимметричными и в перспективе могут так же рассматриваться как кандидаты на роль эффективных лекарственных препаратов (Таблицы 4 и 5), но для дальнейшего изучения выбрали несимметричные соединения, как имеющие более высокий индекс эффективности.

III. 2. Оценка протективной активности производных камфары на модели летальной гриппозной инфекции

В качестве модели летальной гриппозной пневмонии нами были выбраны самки нелинейных мышей-альбиносов, интраназально зараженные вирусом гриппа A/PR/8/34(H1N1). Данные по протективной активности производных камфары *in vivo* суммированы в таблице 14.

Динамика смертности мышей в ходе гриппозной пневмонии, вызванной вирусом A/PR/8/34(H1N1).

Таблица 14.

Соединение	смертность на срок после заражения (сут.)										Mr	IP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
2274					7						70%	0
2273			3		4						70%	0
Камфецин					1						10%	86%
Контроль вируса					5	2					70%	-

Несмотря на значительную противовирусную активность, проявленную тремя исследуемыми препаратами *in vitro*, только препарат №1007 (камфецин) продемонстрировал протективную активность *in vivo* (индекс защиты 86%).

III. 3. Изучение морфогенеза гриппозной инфекции в условиях применения камфецина

Клинические признаки заболевания были типичными для гриппозной инфекции, они включали затрудненное дыхание, атаксию, тремор, снижение температуры тела, а также снижение потребления корма и воды. Неспецифической смертности в группе интактных животных отмечено не было.

Легкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, его клетки выглядели интактными – в них не отмечали признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических включений. В просветах бронхов не выявляли экссудата и клеточного детрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели здоровыми, альвеолярные стенки не утолщены, из клеток инфильтрата в легочной паренхиме отмечали отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаружили (рис. 12).

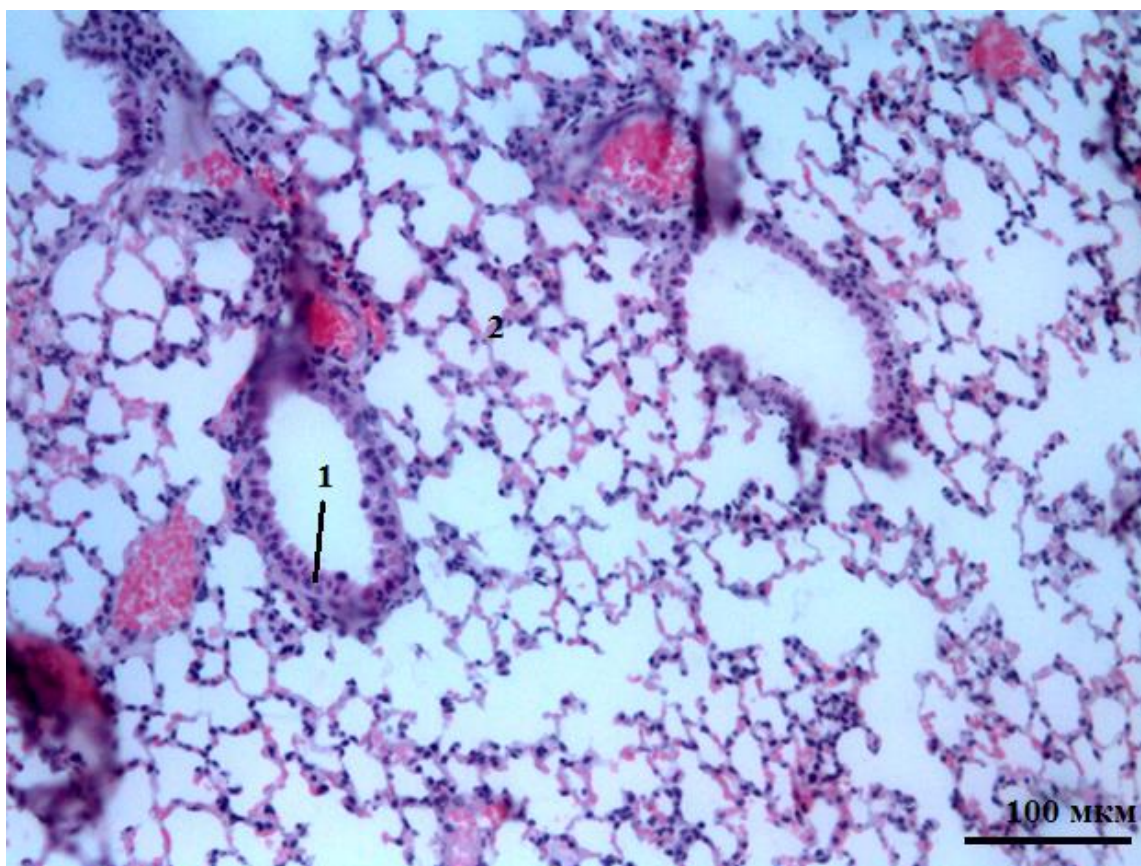


Рисунок 12. Гистологический препарат легких здоровых интактных мышей. 1 – бронх, 2 – альвеолы. Окраска гематоксилин-эозином.

У зараженных животных, не получавших лечения, морфологические изменения легочной ткани на 5-е сутки после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением пораженных клеток в просвет бронха. Базальная мембрана при этом обнажалась, что способствовало повышению ее проницаемости и миграции в просвет бронхов и альвеол клеточных элементов (рис. 13). Во многих очагах поражения просветы альвеол были целиком заполнены клетками, межальвеолярные перегородки выглядели утолщенными и отечными. Эти процессы приводили к интенсивному серозному интерстициальному отеку, появлению очагов геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширению сосудов и спадению альвеол (рис. 14). Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии.

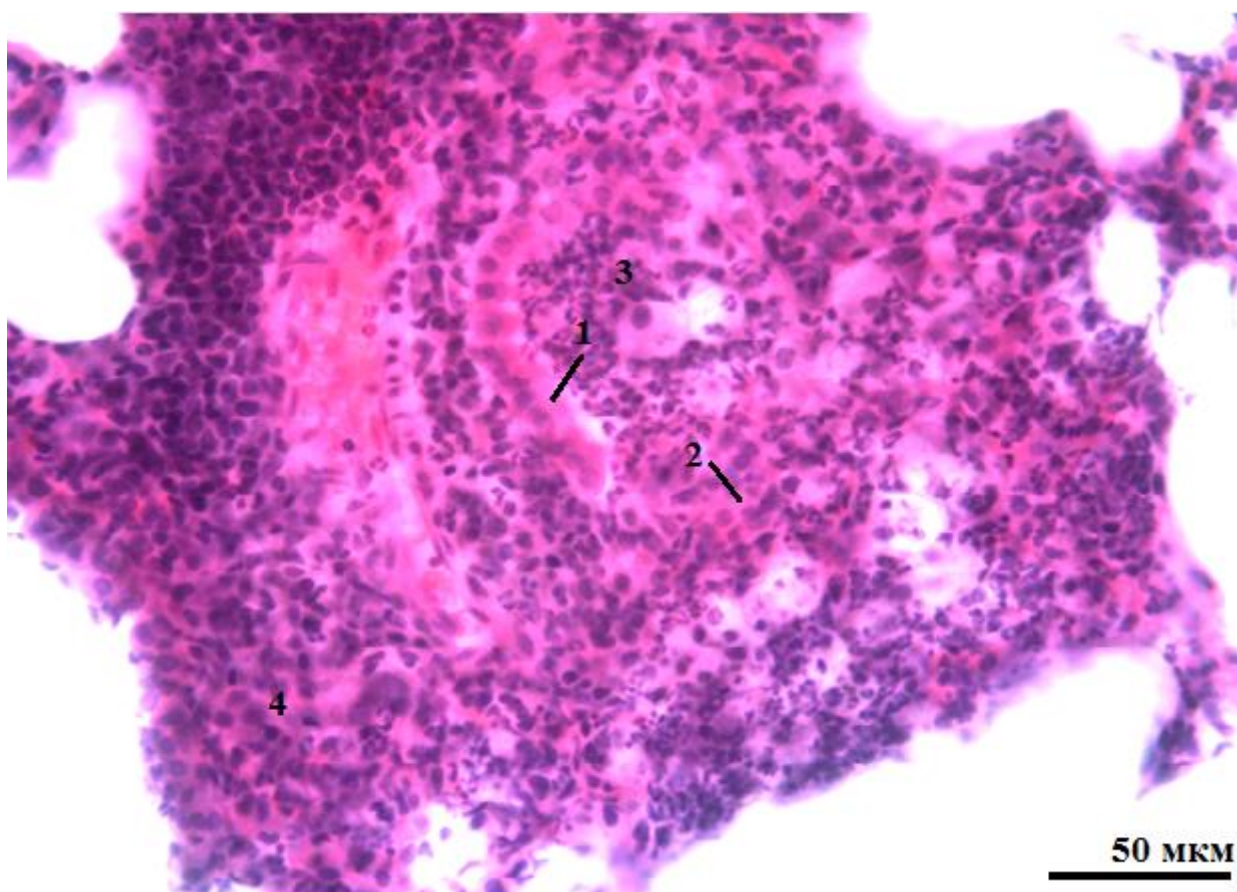


Рисунок 13. Гистологический препарат бронха животного, пораженного гриппозной пневмонией на 5е сутки после заражения. 1 – эпителий бронха, 2 – базальная мембрана, 3 – инфильтрат в просвете бронха, 4 – альвеолы заполненные воспалительным инфильтратом . Окраска гематоксилин-эозином.

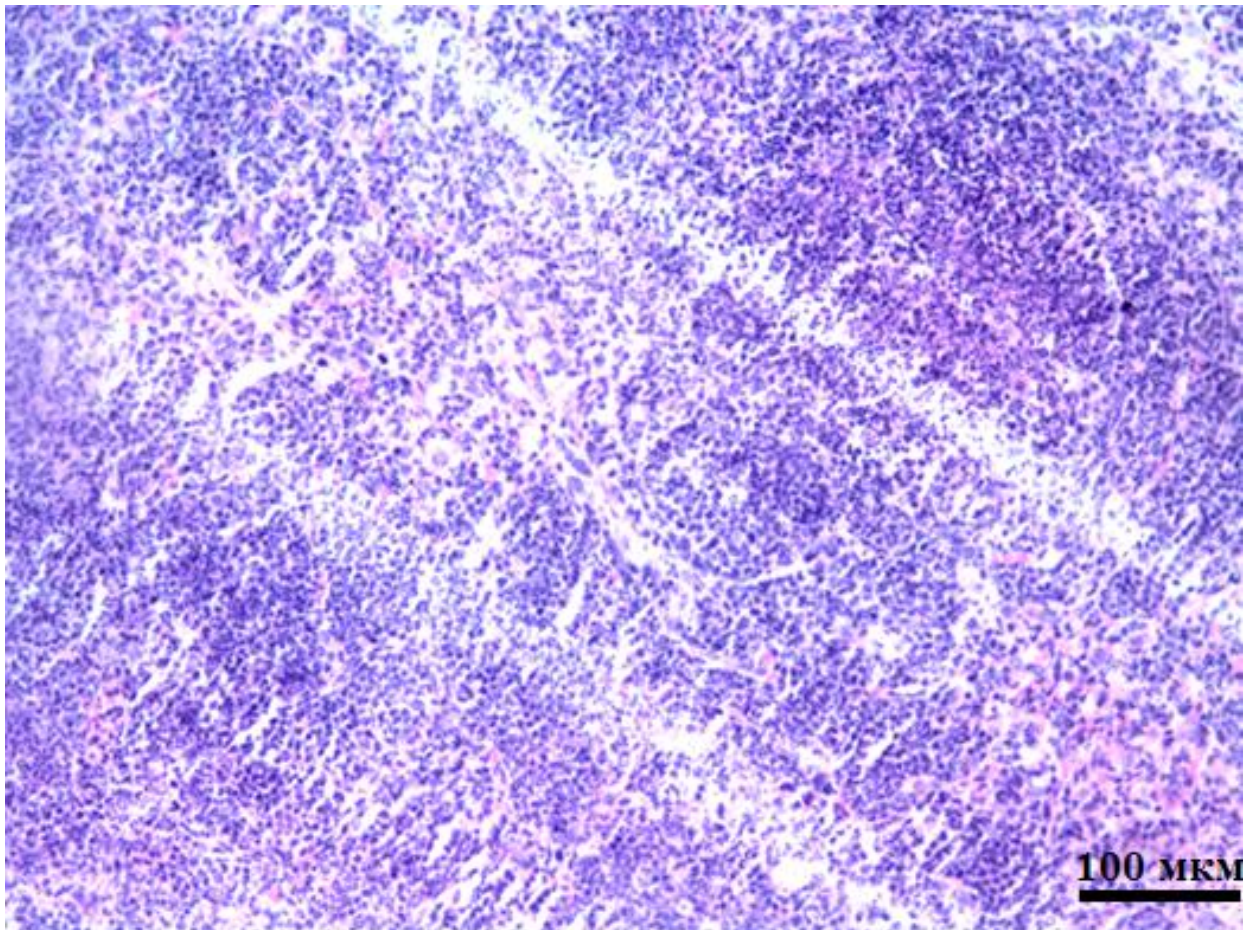


Рисунок 14. Легкие животного, пораженного гриппозной пневмонией, на 5е сутки после заражения. Наблюдается обширная инфильтрация и разрушение бронхов. Окраска гематоксилин-эозином.

На 10-е сутки, при переходе заболевания в хроническую стадию количество очагов воспаления несколько снижалось, архитектура легких восстанавливалась. В бронхах расположенных в очагах поражения, наблюдалась гиперплазия, что является характерным признаком хронической вирусной пневмонии. В альвеолах отмечался интенсивный воспалительный экссудат и признаки цитодеструкции (рис. 15, 16).

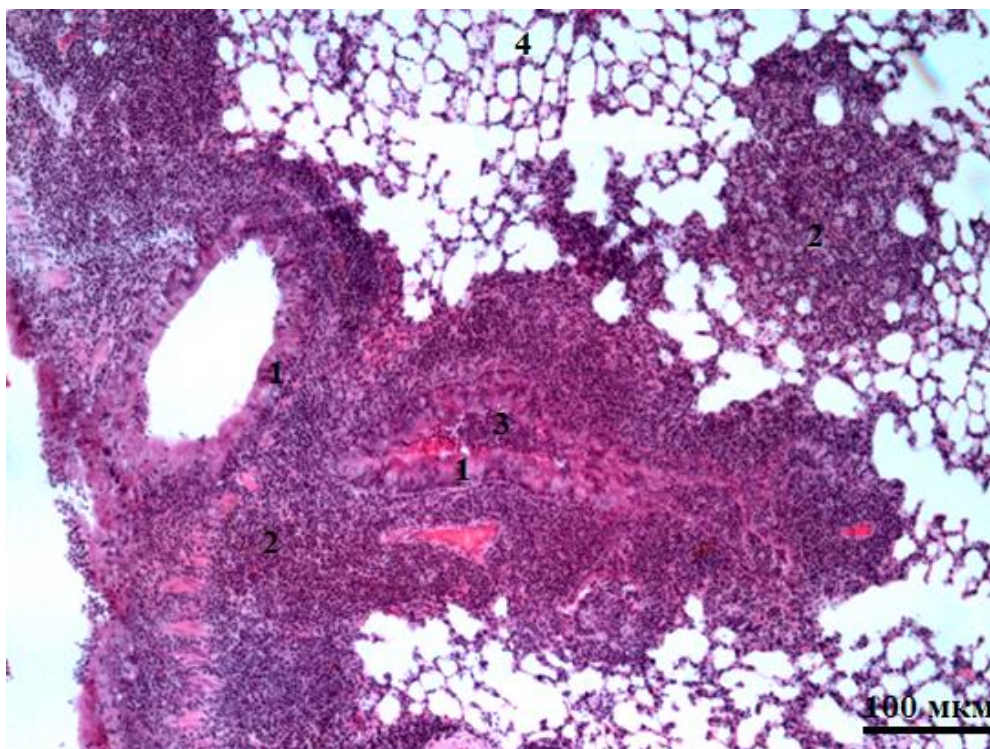


Рисунок 15. Легкие животного, пораженного гриппозной пневмонией, на 10-е сутки после заражения. Окраска гематоксилин-эозином. 1 – гиперплазия эпителия бронхов, 2 – альвеолы, заполненные воспалительным инфильтратом, 3 – воспалительный инфильтрат в бронхе.

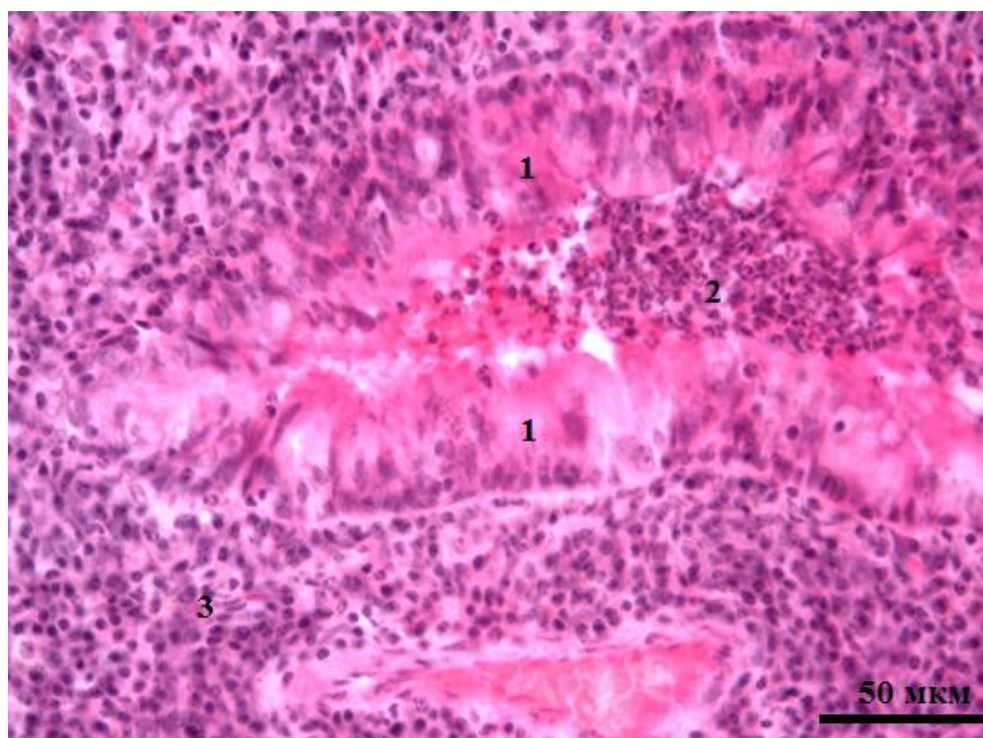


Рисунок 16. Гистологический препарат бронха животного, пораженного гриппозной пневмонией, на 10е сутки после заражения. Окраска гематоксилин-эозином. 1 – гиперплазия эпителия бронхов, 2 – воспалительный инфильтрат в просвете бронха, 3 – альвеолы, заполненные воспалительным инфильтратом.

При использовании камфецина наблюдались заметные отличия морфологической структуры легких животных, прошедших лечение, от таковых в контрольных группах. Основное отличие от группы животных, не получавших лечения, заключалось в ограничении признаков вирусспецифического и реактивного поражения ткани легких на острой стадии гриппозной пневмонии. Как на 5-е, так и на 10-е сутки после инфицирования клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными (рис. 17, 18) в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у животных контрольной группы. Сами очаги воспаления занимали меньшую площадь по сравнению с таковой в контроле. В то же время препарат не приводил к существенному улучшению архитектоники легких.

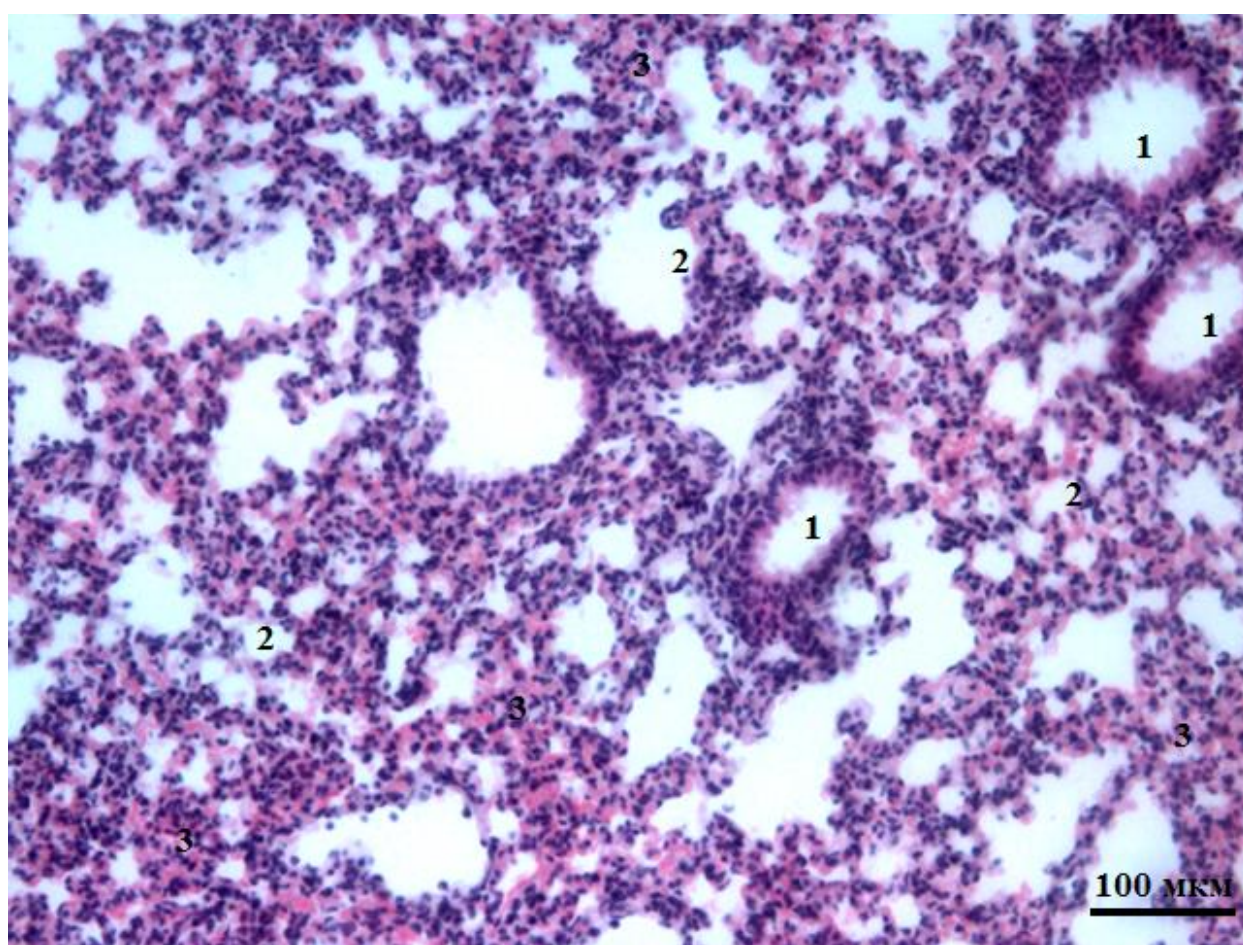


Рисунок 17. Легкие животного, пораженного гриппозной пневмонией, на 5е сутки после заражения на фоне применения камфецина. 1 – бронхи, 2 – функционирующие альвеолы, 3 –альвеолы, заполненные инфильтратом. Окраска гематоксилин-эозином.

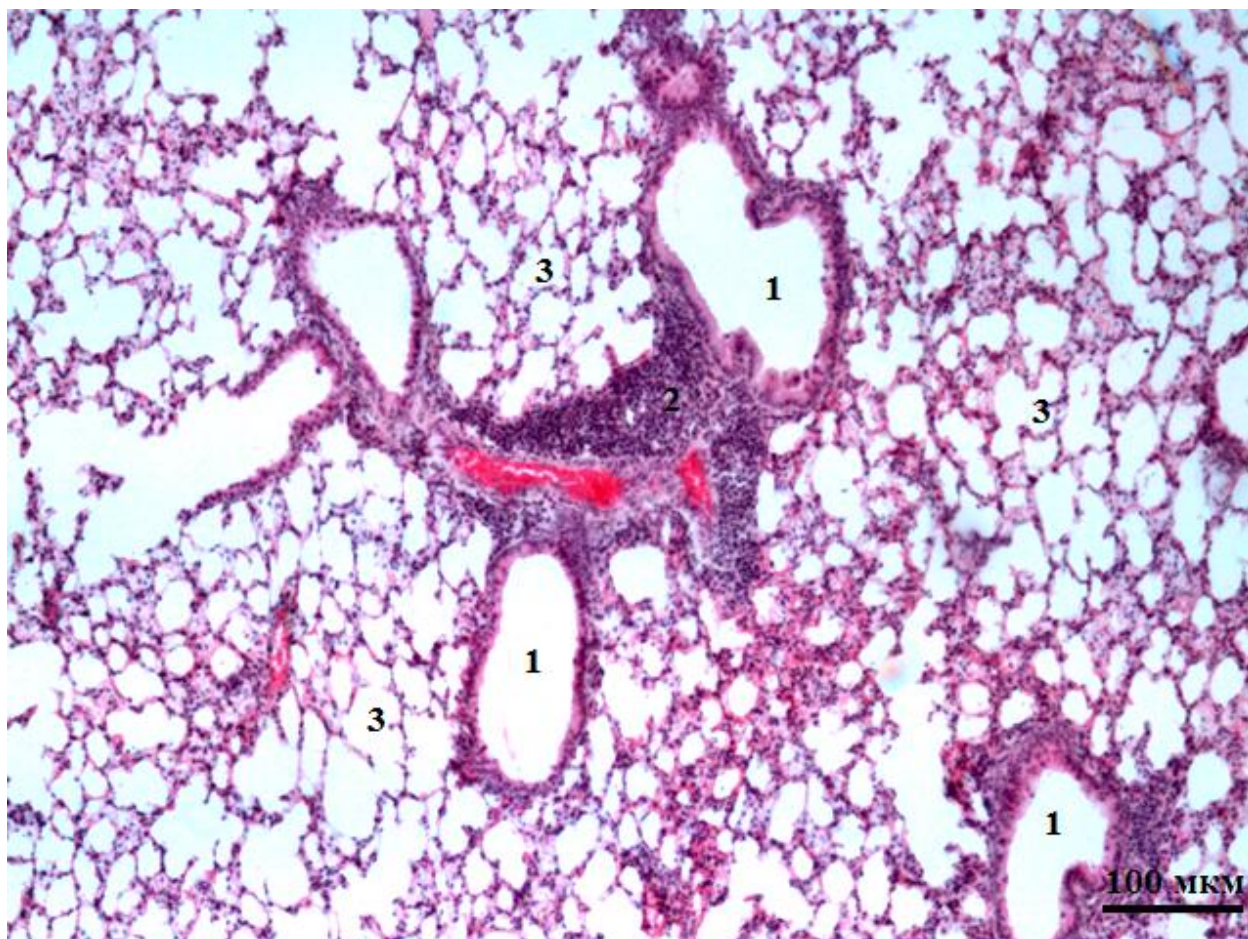


Рисунок 18. Легкие животного, пораженного гриппозной пневмонией, на 10е сутки после заражения на фоне применения камфецина. 1 – бронхи, 2 – альвеолы, заполненные инфильтратом, 3 – здоровые альвеолы. Окраска гематоксилин-эозином.

Для количественной оценки степени поражения тканей легких в опытных и контрольных группах был произведен визуальный анализ легких подопытных животных. Данные приведены в таблицах 15 и 16.

Интенсивность гриппозной пневмонии у мышей, инфицированных вирусом гриппа В/Lee/40, в условиях применения камфецина Таблица 15.

Животное, №	Контроль		Камфецин	
	5 день	10 день	5 день	10 день
1	45%	15%	20%	5%
2	65%	20%	10%	0%
3	100%	10%	15%	10%
4	50%	10%	15%	5%
5	75%	15%	25%	0%
Средний объем поражения.	67,0±22,0%	14,0±4,2%	17,0±5,7%	4,0±4,2%

Интенсивность гриппозной пневмонии у мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Владивосток/2/09, в условиях применения камфецина Таблица 16.

Животное, №	Контроль		Камфецин		Тамифлю	
	5 день	10 день	5 день	10 день	5 день	10 день
1	95%	10%	30%	5%	5%	5%
2	80%	25%	30%	10%	10%	0%
3	60%	20%	40%	5%	5%	0%
4	80%	25%	20%	5%	5%	5%
5	50%	15%	50%	5%	10%	0%
Средний объем поражения.	73,0±17,9%	19,0±6,5%	34,0±11,4%	6,0±2,2%	7,0±2,7%	2,0±2,7%

Инфицирование животных вирусом гриппа А/Владивосток/2/09 приводит к формированию в легких очагов хронического поражения, занимающих на 5-й день 73%. К 10 дню происходит восстановление легких, остаются пораженными только 19% площади легких.

Для вируса В/Lee/40 размер поражения определен как 67% и 14% соответственно. Применение препарата сравнения Тамифлю существенно ограничивает этот показатель (для вируса гриппа А/Владивосток/2/09 – на 5й день 7% на 10й день - 2%). Камфецин обладает протективной активностью в отношении обоих вирусов, снижая объем поражения на 5й день для вируса В/Lee/40 до 17%, а для вируса А/Владивосток/2/09 до 34%. На 10й день – до 4% и 6% соответственно.

III. 3. Изучение влияния камфецина на ультраструктурные особенности морфогенеза гриппозной инфекции *in vitro*

Для детальной характеристики биологической активности производных камфары при помощи электронной микроскопии был проведён морфологический анализ клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа. Влияние производных камфары было изучено на примере камфецина – одного из наиболее активных соединений этой группы.

Как было показано в ходе ультраструктурных исследований, клетки интактной культуры MDCK имели округлую или продолговатую форму и содержали крупное центрально расположенное ядро. В цитоплазме находились многочисленные округлые или овальные митохондрии, вакуоли гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети. В вакуолях определялись рыхлые округлые тела умеренной электронной плотности. Аппарат Гольджи был представлен скоплениями уплощённых цистерн, вакуолями и микропузырьками. Ядерный хроматин в нуклеоплазме в виде конденсатов располагался по всему объему ядра, в центре которого обнаруживались крупные ядрышки (рис. 19). На

поверхности клеток находились немногочисленные реснички, идентифицируемые по характерному внутреннему цитоскелету. Подобная структура органелл типична для интактных клеток.

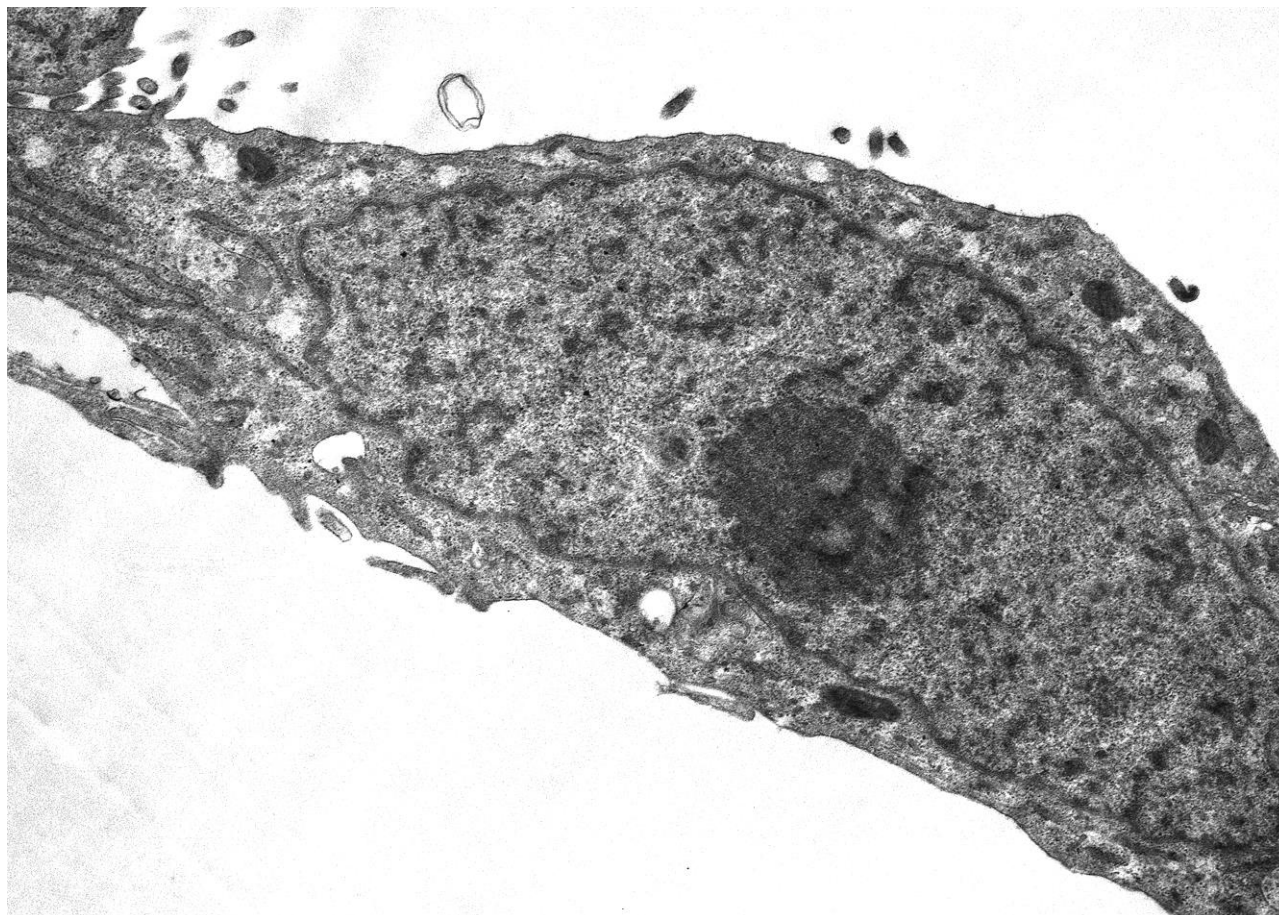


Рисунок 19. Клетка интактной культуры MDCK. (x10 000).

Заражение вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) приводило к развитию в клетках характерных изменений клеточных структур. Так, уже через 1 час после инфицирования в цитоплазме отмечались многочисленные везикулы с включениями, представляющие собой эндосомы, содержащие вирусные частицы (рис. 20). В ряде случаев отмечалось начало слияния вирусной и эндосомной мембран, что приводило к формированию характерных структур (рис. 21).

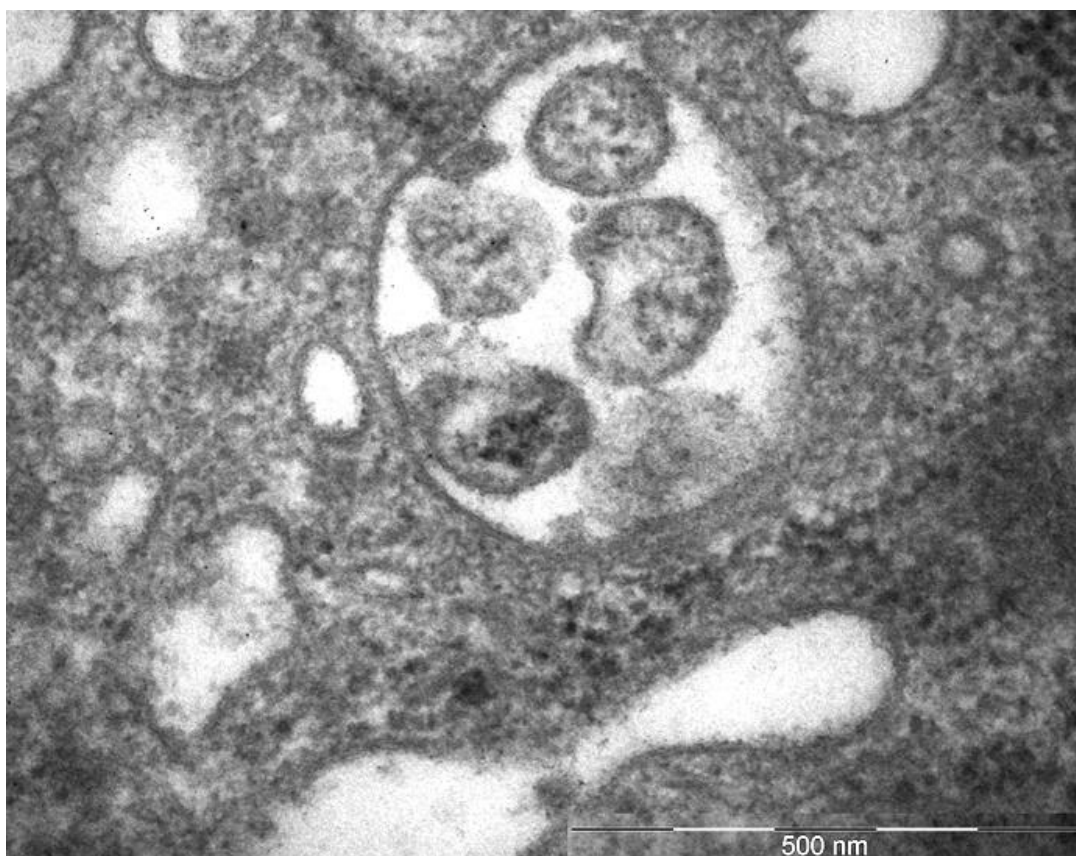


Рисунок 20. Эндосома с вирионами в цитоплазме клетки MDCK через 1 час после инфицирования вирусом гриппа A/Puerto Rico//34 (H1N1).

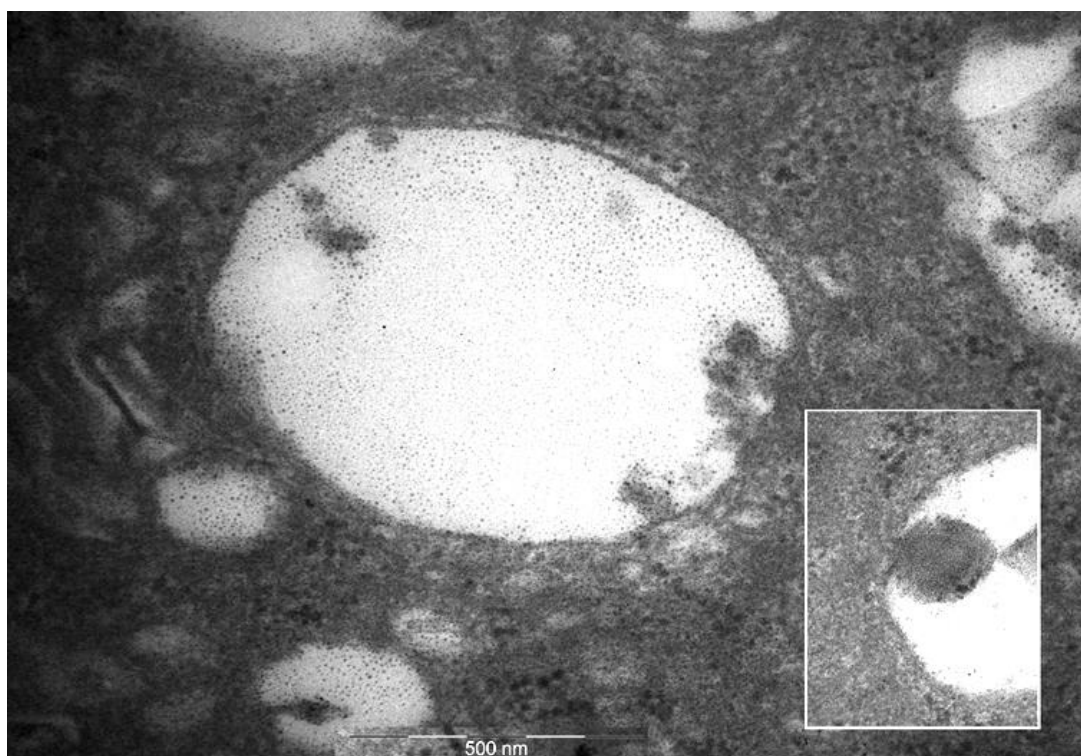


Рисунок 21. Агломераты вирионов и слияние вирусной и эндосомной мембран (на врезке) в цитоплазме клетки MDCK через 1 час после инфицирования вирусом гриппа A/Puerto

Rico/34 (H1N1).

Через 4 часа после инфицирования в ядрах клеток наблюдались пересортировка хроматина и развитие многочисленных оформленных (фибриллярных) и диффузных ядерных включений различной плотности. В их составе были хорошо различимы типичные спиральные структуры, представляющие собой новосинтезированные рибонуклеопротеиды, ещё не покрытые оболочкой (рис.22).

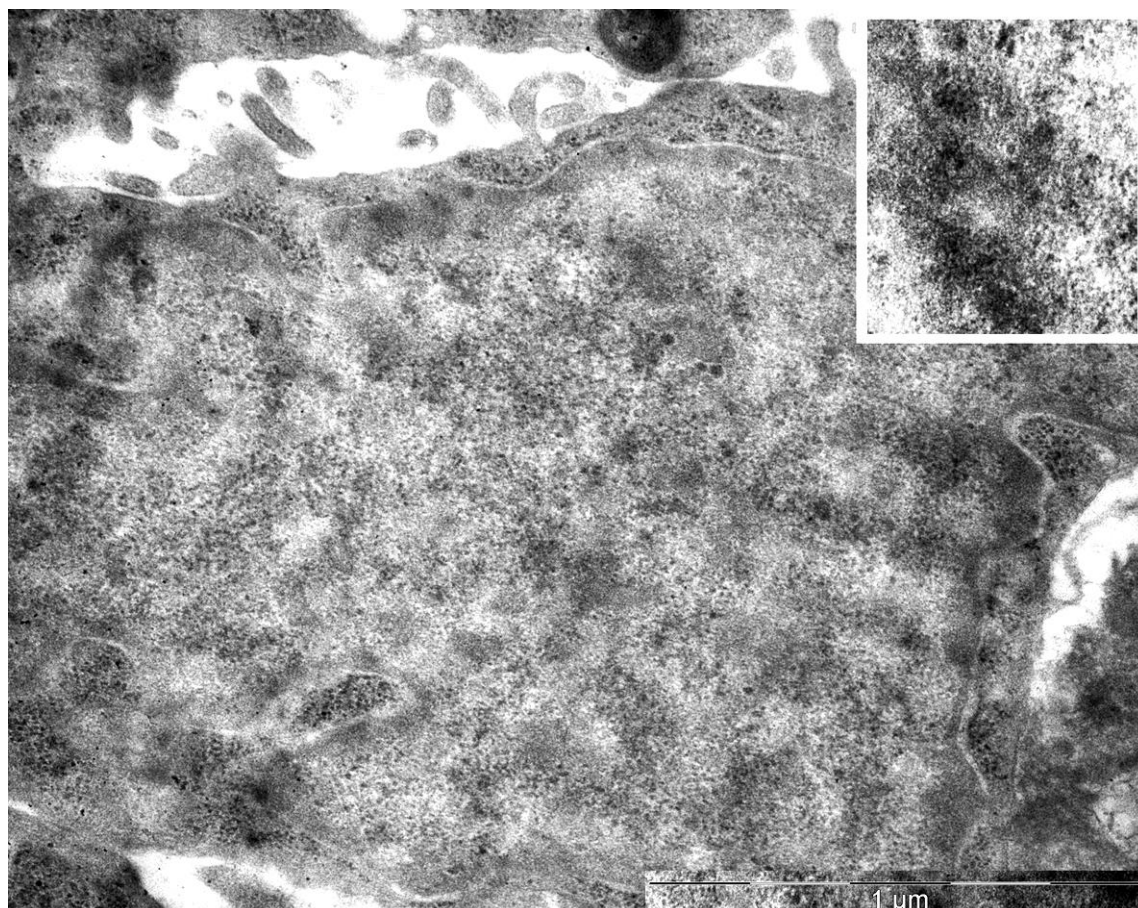


Рисунок 22. Вирусспецифические включения в ядре клетки MDCK через 4 часа после заражения вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Видна спиральная структура нуклеокапсидов (на врезке).

Клетки незаражённой культуры, инкубированные с камфецином в течение 1 и 4 часов выглядели интактными, их органеллы были сохранены и морфологически не отличались от соответствующих структур контрольных клеток.

На ранних сроках инфицирования (1 час) процесс эндоцитоза вирусов в присутствии камфецина морфологически не отличался от контрольной культуры. Как и в отсутствие препарата, через 1 час после инфицирования в цитоплазме наблюдались

многочисленные эндосомы, содержащие вирусные частицы. Однако, в отличие от контрольных культур, вирионов, находящихся в стадии слияния мембран, не было отмечено вообще.

Применение камфецина существенно ограничивало признаки вирусной репликации в клетках. Так, через 4 часа после инфицирования клетки MDCK морфологически не отличались от интактной культуры. Признаков вирусной репликации или цитотоксического эффекта не наблюдалось ни в ядре, ни в цитоплазме клеток (рис. 23).

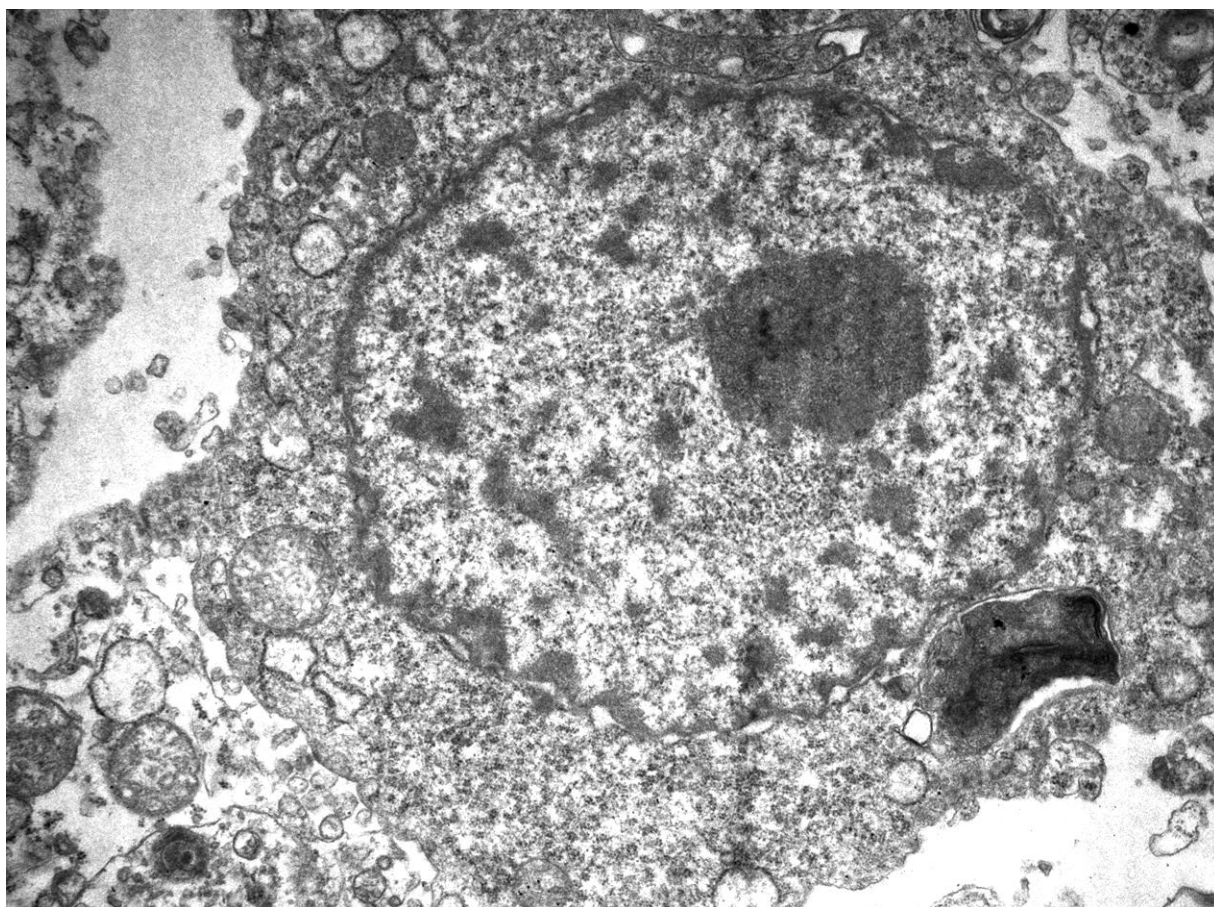


Рисунок 23. Клетка культуры MDCK через 4 часа после инфицирования вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения камфецина.

Таким образом, в результате проведённых ультраструктурных исследований показано, что основным механизмом противовирусного действия камфецина является ингибирование процесса слияния мембран, что в дальнейшем приводит к торможению вирусного морфогенеза и как следствие - снижению уровня вирусной репродукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели гриппозной инфекции в культуре клеток MDCK была проанализирована противовирусная активность и цитотоксичность 37 соединений, из них 4 относились к изомерам камфары, 17 к симметричным и 26 – к несимметричным ее иминопроводным. Среди иминопроводных камфары обнаружены соединения, обладающие высоким уровнем противовирусной активности в отношении вируса гриппа типа А *in vitro*.

Среди несимметричных иминопроводных наиболее высокую эффективность имеют соединения, в составе радикала которых есть гидроксильная группа, напрямую или с помощью короткого алифатического линкера присоединенная к иминогруппе. Эти же соединения характеризуются низкой токсичностью, что дает возможность рассматривать их в качестве перспективных лекарственных препаратов.

Среди симметричных иминов наиболее эффективными являются соединения с коротким алифатическим линкером, соединяющим камфарные группы. Наибольшей среди исследуемых препаратов токсичностью обладают несимметричные иминопроводные, имеющие в составе радикала бензольное кольцо и симметричные, в которых иминогруппы заменены на аминогруппы.

Было показано, что иминопроводное камфары, содержащее в своем составе гидроксильную группу, присоединенную к иминогруппе через короткий алифатический линкер снижает объем поражения легких и смертность с 70 до 10%, при летальной гриппозной пневмонии *in vivo*.

При более детальном изучении протективной активности исследуемого соединения было обнаружено, что его применение снижает объем вирусного поражения легких: для вируса гриппа типа А с 73% до 34% в острой фазе и с 19% до 6% - в хронической; для вируса типа В – с 67% до 17% и с 14% до 4% соответственно. Кроме того, использование препарата повышает сохранность эпителия бронхов.

В результате проведенных ультраструктурных исследований было показано, что основным механизмом противовирусного действия камфецина является ингибирование процесса слияния мембран, что в дальнейшем приводит к торможению вирусного морфогенеза и как следствие - снижению уровня вирусной репродукции.

ВЫВОДЫ

1. Иминопроизводные камфары *in vitro* демонстрируют высокий уровень противовирусной активности. Наиболее эффективным из них и при этом малотоксичным является соединение №1007 (камфецин).
2. Применение камфецина при летальной гриппозной пневмонии способствует увеличению выживаемости подопытных животных с 30% до 90% (индекс защиты 86%).
3. При летальной гриппозной пневмонии применение камфецина значительно снижает объем поражения легких (для вируса гриппа типа А с 73% до 34% в острой фазе и с 19% до 6% - в хронической; для вируса типа В – с 67% до 17% и с 14% до 4% соответственно), а так же способствует сохранению целостности эпителия бронхов.
4. Основным механизмом противовирусного действия камфецина является ингибирование процесса слияния мембран.

Автор

Хорошавина Галина Сергеевна

Научные руководители

к.б.н. А.В. Мигунова

к.б.н. В.В. Зарубаев

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев А.А., Бурцева Е.И., Слепушкин А.Н. и др. Арбидол – новое средство для профилактики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций у детей // Вестн. РАМН. - 1996. - № 8. - С. 34 – 37.
2. Васильева О.В., Любичкий О.Б., Гуськова Т.А. и др. Антиоксидантные свойства арбидола и его аналогов // Вопр. мед. химии. - 1999. - № 4.
3. Вотяков В.И., Грибкова Н.В., Казак Н.Ф., Подольская И.А. Механизм активности 2-(1-аминоэтил)бицикло(2.2.1)гептан хлоргидрата. //Вопросы вирусологии. – 1982. - №27. - Т. 4. - С. 47-56.
4. Гагаринова В.М., Игнатьева Г.С., Синицкая Л.В. и др. Новый химиопрепарат арбидол: профилактическая эффективность во время эпидемий гриппа // ЖМЭИ. - 1993. - № 5. - С. 40 – 43.
5. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия / Под ред. О.И. Киселева, И.Г. Маринича, А.А. Сомининой. – СПб., 2003. – 245 с.
6. Деева Э.Г., Мельникова Т.И. Антивирусные препараты для профилактики и лечения гриппа.// Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2009. - № 4 (47). – С. 38-44.
7. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. – М. - 1998. - С. 141.
8. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. – М. - 1996. - С. 30 – 32.
9. Злыдников Д.М., Кубарь О.И., Ковалева Т.П. Химиопрофилактика и химиотерапия гриппа ремантадином // Вопросы вирусологии. - 1981. - № 5. - С. 516 – 523.
10. Киселёв О.И., Мишин В.П., Ерошкин В.И. и др. Вторичная структура белка М2 вируса гриппа А и его роль в формировании резистентности к ремантадину и дейтифорину. //Мол. биология. - 1994. - Т. 28. - Вып. 5. - С. 1009–1013.
11. Киселев О.И. Амиксин – структура, механизмы действия и перспективы применения // Человек и лекарство. - 1998.
12. Киселев О.И. Фармакотерапия: профилактика и лечение гриппа // Фармацевтический вестник. 2001. - № 4 – С.203.
13. Киселёв О.И., Блинов В.М., Платонов В.Г. и др. Организация белков М1 и М2 в мембранах и молекулярная модель действия ремантадина // Химиотерапия и химиопрофилактика гриппа и ОРЗ. - Под ред. Киселёва О.И. - Л. - 1990. - С. 10–16.
14. Киселев О.И., Деева Э.Г., Слита А.В., Платонов В.Г. Антивирусные препараты для лечения гриппа и ОРЗ. Дизайн препаратов на основе полимерных носителей. – СПб.: Время. - 2000. – 132 с.

15. Маянский А.Н. Вирус гриппа А: строение, экология, патология. //Вопросы диагностики в педиатрии. - Том 1. - №6. - С. 8-17.
16. Несмеянов А. Н. Начала органической химии. — М.: Химия, 1969. — Т. 1. — С. 582—585.
17. Патент RU 2448692 С2, оп. 27.04.2012
18. Патент РФ 2520967.
19. Романцов М.Г. Циклоферон: применение в клинике. – М.–СПб. - 1997. - С. 9 – 11.
20. Селькова Е.П. Применение амиксина для профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций: Методические рекомендации. – М., 2000. – С. 32.
21. Смирнов В. С. Современные средства профилактики и лечения гриппа и ОРВИ // СПб: ФАРМиндекс. - 2008. - 48 с.
22. Тандура С.Н., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Киселёв О.И. Противогриппозный химиопрепарат Дейтифорин // Антибиотики и химиотерапия. - 2013. - №58. – Т. 1. – С. 38.
23. Acha P.N., Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals // Chlamydiosis, rickettsioses and viroses. - 3rd ed. Washington DC. - 2003. - Scientific and Technical Publication No. 580. Influenza; P. 155-72.
24. Beard CW. Avian influenza. In: Foreign animal diseases. Richmond // VA: United States Animal Health Association. - 1998. - P. 71-80.
25. Brown IH, Harris PA, Alexander DJ. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2 // Epidemiol Infect. – 1995. – V. 114. – P. 511-520.
26. Cady S.D., Schmidt-Rohr K., Wang J., Soto C.S., DeGrado W.F., Hong M.H. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers // Nature. - 2010. - Vol.463. - P. 689-692.
27. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. Avian flu [Website online]. CDC. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/avian/index.htm>. Accessed 1 Aug 2007.
28. Colizza V., Barrat A., Barthelemy M., Vespignani A. The role of the airline transportation network in the prediction and predictability of global epidemics // Proc Nat Acad Scien USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 2015—2020.
29. Couch RB. Orthomyxoviruses [monograph online]. In: Baron S, editor // Medical microbiology. - 4th ed. New York: Churchill Livingstone. - 1996. - Available at: <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/>.

30. Davies, W.L.; Grunert, R.R.; Haff, R.F.; McGahen, J.W.; Neumayer, E.M; Paulshock, M; Watts, J.C; Wood, T.R.; Hermann, E.C; Hoffmann, C.E. Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine) // *Science*. - 1964. - V. 144. - P. 862
31. Dorr R.T. Interferon α in malignant and viral diseases: a review // *Drugs*. - 1993. - V. 45. - P. 177 – 211.
32. Ducatez, M.F., Pelletier, C., Meyer, G. Influenza D Virus in Cattle,. France, 2011-2014 // *Emerg Infect.* – 2015. - Dis 21. – P. 368-371.
33. Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. *Veterinary virology*. San Diego. - CA: Academic Press Inc. - 1987. – Orthomyxoviridae. - P. 473-484.
34. Ferguson N. M., Cummings D. A., Fraser C., Cajka J. C., Cooley P. C., Burke D. S. Strategies for mitigating an influenza pandemic // *Nature*. - 2006. - V. 442. - P. 448—452.
35. Flahault A. Global monitoring of influenza: potential contribution of national networks from a French perspective // *Expert Rev Antiinfect Ther.* - 2006. - V. 4. – P. 387—393.
36. Greenbaum E, Morag A, Zakay-Rones Z. Isolation of influenza C virus during an outbreak of influenza A and B viruses // *J Clin Microbiol.* – 1998. - V. 36. – P. 1441-1442.
37. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* - 2008. – V. 15. – P. 690–98.
38. Hause, B.M., Collin, E.A., Liu, R.X., Huang, B., Sheng, Z.Z., Lu, W.X., Wang, D., Nelson, E.A., Li, F. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the orthomyxoviridae family // *mBio*. – 2004. – V. 5. – P.10.
39. Hause, B.M., Ducatez, M., Collin, E.A., Ran, Z.G., Liu, R.X., Sheng, Z.Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A.D., Webby, R.J., Simonson, R.R., Li, F. Isolation of a novel swine influenza virus from oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses // *PLoS Pathog.* - , 2013. - №9. – P. 11.
40. Hay A.J., Lomniczi B., Bellamy A.R., Skehel J.J. Transcription of the influenza virus genome // *Virology*. – 1977. – V. 83. – № 2. – P. 337-355.
41. Heinen P. Swine influenza: a zoonosis // *Vet Sci Tomorrow [serial online]*. – 2003. - Sept 15.
42. Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus // *Cell*. – 1992. – V. 69. – № 4. – P. 577-578.
43. <http://allwantsimg.com/virus-grippa>
44. Hutchinson E.C., von Kirchbach J.C., Gog J.R., Digard P. Genome packaging in influenza A virus // *J Gen Virol.* – 2010. – V. 91. – № Pt 2. – P. 313-328.
45. Hutchinson E.C., von Kirchbach J.C., Gog J.R., Digard P. Genome packaging in influenza A virus // *J Gen Virol.* – 2010. – V. 91. – № Pt 2. – P. 313-328.

46. Isin B., Doruker P., Bahar I. Functional motions of influenza virus hemagglutinin: a structure-based analytical approach // *Biophys J.* – 2002. – V. 82. – № 2. – P. 569-581.
47. Ison M.G. Antivirals and resistance: influenza virus // *Curr Opin Virol.* - 2011. - №1. – P. 563–573.
48. Ivanovic T, Choi JL, Whelan SP, van Oijen AM, Harrison SC. Influenza-virus membrane fusion by cooperative fold-back of stochastically induced hemagglutinin intermediates // *eLife.* – 2013. - №2. - e00333.
49. Jakeman KJ, Tisdale M, Russell S, Leone A, Sweet C. Efficacy of 2'-deoxy-2'-fluororibosides against influenza A and B viruses in ferrets // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1994. №38. – P. 1864-1867.
50. Jiang, W.M., Wang, S.C., Peng, C., Yu, J.M., Zhuang, Q.Y., Hou, G.Y., Liu, S., Li, J.P., Chen, J.M. Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China // *Virus Genes.* – 2014. - №49. – P. 493-496.
51. Kimura H, Abiko C, Peng G, Muraki Y, Sugawara K, Hongo S, Kitame F, Mizuta K, Numazaki Y, Suzuki H, Nakamura K. Interspecies transmission of influenza C virus between humans and pigs // *Virus Res.* – 1997. - №48. – P. 71-79.
52. Komadina N, Roque V, Thawatsupha P, Rimando-Magalong J, Waicharoen S, Bomasang E, Sawanpanyalert P, Rivera M, Iannello P, Hurt AC, Barr IG. Genetic analysis of two influenza A (H1) swine viruses isolated from humans in Thailand and the Philippines // *Virus Genes.* – 2007. - №35. – P. 161-165.
53. Kraulis, J.P. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures // *J. Appl. Crystallogr.* – 1991. - №24. – P. 946–950.
54. Lamb R.A., Zebedee S.L., Richardson C.D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface // *Cell.* – 1985. – V. 40. – № 3. – P. 627-633.
55. Lamb R.A., Zebedee S.L., Richardson C.D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface // *Cell.* – 1985. – V. 40. – № 3. – P.627-633.
56. Liu C., Eichelberger M.C., Compans R.W., Air G.M. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding // *J Virol.* – 1995. – V. 69. – № 2. – P. 1099-1106.
57. Manuguerra JC, Hannoun C, Simon F, Villar E, Cabezas JA. Natural infection of dogs by influenza C virus: a serological survey in Spain // *New Microbiol.* – 1993. - №16. - P. 367-71.

58. Matsuzaki Y, Abiko C, Mizuta K, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Suzuki H, Mikawa M, Shimada S, Sato K, Kuzuya M, Takao S, Wakatsuki K, Itagaki T, Hongo S, Nishimura H. A nationwide epidemic of influenza C virus in Japan in 2004 // *J Clin Microbiol.* – 2007. - №45. – P.783-788.
59. Matsuzaki Y, Mizuta K, Sugawara K, Tsuchiya E, Muraki Y, Hongo S, Suzuki H, Nishimura H. Frequent reassortment among influenza C viruses // *J. Virol.* – 2003. - №77. – P. 871–81.
60. Matsuzaki Y, Sugawara K, Mizuta K, Tsuchiya E, Muraki Y, Hongo S, Suzuki H, Nakamura K. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998 // *J Clin Microbiol.* – 2002. - V. 40. – P. 422-429.
61. Nayak D.P., Hui E.K., Barman S. Assembly and budding of influenza virus // *Virus Res.* – 2004. – V. 106. – № 2. – P. 147-165.
62. Olsen CW, Brammer L, Easterday BC, Arden N, Belay E, Baker I, Cox NJ. Serologic evidence of H1 swine influenza virus infection in swine farm residents and employees // *Emerg Infect Dis.* - 2002. – V. 8. – P. 814-819.
63. O'Neill R.E., Jaskunas R., Blobel G., Palese P., Moroianu J. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import // *J Biol Chem.* – 1995. – V. 270. – № 39. – P. 22701-22704.
64. Portela A., Zurcher T., Nieto A., Ortin J. Replication of orthomyxoviruses // *Adv Virus Res.* –1999. – V. 54. – P. 319-348.
65. Public Health Agency of Canada. Material Safety Data Sheet – Influenza virus. Office of Laboratory Security; 2001 Sept. Available at: <http://www.phacaspc.gc.ca/msds-ftss/index.html>. Accessed 24 Aug 2004.
66. Reid AH, Taubenberger JK. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma // *J Gen Virol.* – 2003. - №84. – P. 2285-2292.
67. Reuman P.D. Immunomodulators // *Pediatr. Infect. Dis. J.* - 2001. - V. 20 (10). - P. 995-996.
68. Scholtissek C, Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. // *Antiviral Res.* – 1998. - V. 37. - P. 83-95.
69. Schulze I.T. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin // *J Infect Dis.* – 1997. – V. 176 Suppl 1. – №. – P. S24-8.
70. Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin // *Annu Rev Biochem.* – 2000. – V. 69. – P. 531-69.

71. Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin // *Annu Rev Biochem.* – 2000. – V. 69. – P. 531-69.
72. Smith NM, Bresee JS, Shay DK, Uyeki TM, Cox NJ, Strikas RA. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) // *Morb Mortal Wkly Rep.* – 2006. – V.55(RR-10). - P. 1-42.
73. Sriwilaijaroen N., Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* – 2012. – V. 88. – № 6. – P. 226-249.
74. Stieneke-Grober A., Vey M., Angliker H., Shaw E., Thomas G., Roberts C., Klenk H.D., Garten W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease // *EMBO J.* – 1992. – V. 11. – № 7. – P. 2407-2414.
75. Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, et al. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients // *N. Engl. J. Med.* - №351. – V.5. – P. 438–450.
76. Wang C.C., Chen J.R., Tseng Y.C., Hsu C.H., Hung Y.F., Chen S.W., Chen C.M., Khoo K.H., Cheng T.J., Cheng Y.S., Jan J.T., Wu C.Y., Ma C., Wong C.H. Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – V. 106. – № 43. – P. 18137-18142.
77. Weis W., Brown J.H., Cusack S., Paulson J.C., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid // *Nature.* – 1988. – V. 333. – № 6172. – P. 426-431.
78. Welch BD, Liu Y, Kors CA, Leser GP, Jardetzky TS, Lamb RA. 2012. Structure of the cleavage-activated prefusion form of the parainfluenza virus 5 fusion protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. - № 109. – P. 16672–16677.
79. White J, Helenius A, Gething MJ. Haemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion // *Nature.* – 1982. - №300. – P.658–659.
80. Whittaker G., Bui M., Helenius A. The role of nuclear import and export in influenza virus infection // *Trends Cell Biol.* – 1996. – V. 6. – № 2. – P. 67-71.
81. Wiley D.C., Skehel J.J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus // *Annu Rev Biochem.* – 1987. – V. 56. – P. 365-394.
82. Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at A resolution // *Nature.* – 1981. – V. 289. – № 5796. – P. 366-373.
83. World Organization for Animal Health [OIE]. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [online]. Paris; OIE; 2008. Avian influenza. Available at:

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf. Accessed 31 Dec 2008.

84. Wu Y., Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11 //Trends Microbiol. – 2014. – V. 22. – № 4. – P. 183-191.
85. Yamaoka M, Hotta H, Itoh M, Homma M. Prevalence of antibody to influenza C virus among pigs in Hyogo Prefecture, Japan // J Gen Virol. – 1991. - №72. – P.711-714.
86. Yasuda J., Nakada S., Kato A., Toyoda T., Ishihama A. Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix // Virology. – 1993. – V. 196. – № 1. – P. 249-255.
87. Zhang J., Pekosz A., Lamb R.A. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins // J Virol. – 2000. – V. 74. – № 10. – P. 4634-4644.